

UNIVERSIDAD DEL NORTE
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD



**EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL MICROBIANA
DEL INTESTINO EN EL CONTEXTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.
IMPLICACIONES EN LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS BACTERIAS
PROBIÓTICAS CON UTILIDAD POTENCIAL EN LA INDUSTRIA
FARMACÉUTICA.**

TESIS

Para la obtención del título de:

Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

MARIO ALBERTO PEÑA FREILE

Barranquilla, Colombia

Noviembre 2017

UNIVERSIDAD DEL NORTE
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD



EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL MICROBIANA
DEL INTESTINO EN EL CONTEXTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.
IMPLICACIONES EN LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS BACTERIAS
PROBIÓTICAS CON UTILIDAD POTENCIAL EN LA INDUSTRIA
FARMACÉUTICA.

MARIO ALBERTO PEÑA FREILE

Dr. Homero Sanjuan Vergara, MD, PhD.

Director

Eduardo E. Zurek Varela., PhD

Co director

Barranquilla, Colombia

Noviembre 2017

APROBADO

Jurado 1

Jurado 2

AGRADECIMIENTOS

Grandes agradecimientos al Dr. Homero San Juan por darme la oportunidad de hacer este recorrido y por brindarme este voto de confianza y la libertad de alcanzarlo.

Al Dr. Eduardo Zurek e M.Sc. Iván Portnoy por ayudarme a entender un poco mejor el élfico antiguo de la programación.

A todos los del equipo del laboratorio de Virología de la Universidad del Norte por aceptarme y evitar que destruya los equipos.

Y principalmente a mi Madre Mercedes Freile Lozano y a mi familia, que me representan, me respaldan y me definen.

Ya ti...De aquí a sirio...

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

TABLA DE CONTENIDO	9
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS Y UNIDADES	12
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE FIGURAS	14
RESUMEN	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
2.1 Definición del problema.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS.....	28
4.1. Objetivo General	28
4.2. Objetivos Específicos.....	28
5. ESTADO DEL ARTE	29
5.1 Características Del Virus	29
5.2 Impacto Inmunológico	32
5.3 Papel de la Microbiota Intestinal	35
5.3.1 Importancia de los Metabolitos Bacterianos	39
5.3.1.1 Ácidos grasos de cadena corta.....	40
5.4 Uso de microorganismos de origen intestinal en el desarrollo de productos terapéuticos.	42
5.4.1 Probióticos.....	43
5.5 Tecnologías Para Análisis De Poblaciones Microbianas	47
5.5.1 PCR.....	47
5.5.1.1 PCR En Tiempo Real (q-PCR).....	48
5.5.2 Nuevas Técnicas De Secuenciación.....	49
5.5.2.1 Secuencia De Terminación Reversible (Illumina)	49
5.6 Análisis De Datos Metagenómicos	50
5.6.1 Diversidad Alfa.....	50

5.6.1.1	Curva de rarefacción.....	50
5.6.1.2	Índice de Chao1	51
5.6.1.3	Índice de Shannon	52
5.6.2	<i>Diversidad Beta</i>	52
5.6.2.1	SPLSDA	53
5.6.2.2	SPIEC-EASI (SParse InversE Covariance Estimation for Ecological Association Inference)	53
5.6.2.3	METAGENOMESEQ	53
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
6.1	Obtención de la muestra.....	55
6.2	Secuenciación del gen rARN 16S	55
6.3	Análisis bioinformático de diversidad microbiana	56
6.4	Amplificación de los fragmentos de los genes buk y but por PCR en tiempo real.....	57
6.4.1	<i>Iniciadores</i>	57
6.4.2	<i>Condiciones de la-PCR en tiempo real (q-PCR)</i>	58
6.4.3	<i>Preparación de la curva estándar</i>	58
6.5	Selección de candidatos para uso probiótico	59
7	RESULTADOS.....	60
7.1	Análisis bioinformático de diversidad microbiana	60
7.1.1	<i>Curvas de rarefacción</i>	60
7.1.2	<i>Diversidad Alfa</i>	61
7.1.3	<i>Diversidad Beta</i>	62
7.1.4	<i>Estructura de la comunidad microbiana</i>	63
7.1.5	<i>Patrones de correlación y arquitectura de redes</i>	65
7.1.6	<i>Redes de correlación por método SPIEC-EASI-MB</i>	67
7.1.7	<i>Evaluación por sPLS-DA de bacterias diferenciadoras</i>	70
7.1.8	<i>Evaluación de los OTUs característicos por MetagenomeSeq</i>	74
7.2	PCR en tiempo real (q-PCR).....	76
7.2.1	<i>Preparación de curva estándar</i>	76
7.2.2	<i>Butiril-CoA acetato-CoA-transferasa y butirato kinasa presente en las muestras de heces por q-PCR</i>	78
7.3	Selección de candidatos para uso probiótico	80

8 DISCUSIÓN.....	82
9. CONCLUSIONES.....	89
10. RECOMENDACIONES.....	91
REFERENCIAS	92
ANEXOS	108
A.1. Resultado de secuenciación profunda.	108
A.2 Valores MetagenomeSeq.....	109
A.3 Listado taxonómico correspondiente a los OTUs	110

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS Y UNIDADES

°C	Grados Celsius
OTU	Siglas en inglés Unidad taxonómica operacional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
c/u	Cada uno (a)
CPS	Polisacáridos capsulares
F	<i>Forward</i>
fg	Fentogramos
g	Gramos
h	Horas
seg	Segundos
U/μL	Unidades/microlitro
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
v/v	Relación volumen/volumen
PCA	Análisis de componentes principales
T _m	Temperatura de anillaje

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Listado de productos restauradores de la microbiota intestinal de venta en territorio colombiano.....	46
Tabla 2 Primers utilizados para la cuantificación de los genes bacterianos buk y but.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Las curvas de rarefacción de la diversidad alfa de todas las muestras se acercan a la asíntota, indicando que la profundidad de muestreo fue suficiente para la descripción y el análisis apropiado de los microorganismos presentes en las muestras.	60
Figura 2 Índices de diversidad Alfa donde se aprecian los índices de riqueza entre las muestras del grupo control e individuos infectados con VIH en los que se observa un incremento en la riqueza a través del índice de Shannon y Chao1.....	61
Figura 3 Índices de diversidad Alfa donde se aprecian los índices de riqueza entre las muestras del grupo control e individuos infectados con VIH, discriminados según el grado de activación en los que se observa un cambio en la riqueza correspondiente a través del índice de Shannon y Chao1. ..	62
Figura 4 Análisis de componentes principales de la diversidad beta usando la métrica UNIFRAC ponderada. Los subgrupos de los individuos infectados por HIV tienden a separarse en PC1, en donde el subgrupo HIV-1 se encuentra en el sentido opuesto más distante con respecto al subgrupo HIV-3. Así mismo, el subgrupo HIV-1 tiende a separarse del grupo control.	63
Figura 5 Abundancias relativas de los taxones de Bacterias más abundantes en 6 muestras escogidas al azar entre los dos grupos de muestras, controles sanos e individuos infectados con VIH, a nivel de filos A, familia B y género C.	64
Figura 6 Individuos infectados por HIV muestran un patrón diferencial en la abundancia de correlaciones positivas y negativas con respecto a los individuos del grupo control.	66
Figura 7 Diferencias de los “networks” de la microbiota fecal contruidos a partir de las muestras de los individuos infectados por HIV y los individuos del grupo control. Usando el método SPIEC-EASI MB, las redes se construyeron a partir de la tabla de OTUs cuyos datos fueron transformados usando el método “centered log-ratio” de Aitchison.....	68
Figura 8 Identificación de los “OTUs signatures” asociados al grupo de individuos infectados por HIV. PCA graficando el modelo sPLS-DA alimentado con los OTUs transformados usando “centered log-ratio approach”.....	70
Figura 9 Identificación de los “OTUs signatures” asociados al grupo de individuos infectados por HIV. Gráfica de la contribución de los OTUs del componente 1.	71
Figura 10 Grado de separación existente entre el grupo de sujetos sanos comparado con el grupo de infectados categorizados según el grado de activación de CD4+ explicado por el primer y segundo componente.	73
Figura 11 Identificación de los OTUs diferenciadores agrupados de acuerdo al grado de activación de CD4+ y explicados desde el primer componente.	74
Figura 12 Gráfico de violín que muestra la distinción entre los controles y los pacientes infectados. Se escogieron los OTUs que fueron identificados como marcadores diferenciadores por sPLS-DA y que presentaron un p y p_{adj} significativa ($p < 0,05$). CONTROLES: OTU 48 Succinivibrio; INFECTADOS: OTU 22 Roseburia; OTU 44 Catenibacterium; OTU 18 Lachnospiraceae; OTU 28 Lachnospiraceae; OTU 43 Erysipelotrichaceae.	75

Figura 13 Amplificación de las diluciones de but y buk por PCR en tiempo real con SYBR Green. El rango lineal fue de 1.3×10^1 - 1.3×10^6 copias de but/ μ L de ADN (en azul). Para el gen buk el rango utilizado fue de 6.2×10^1 - 6.2×10^6 copias de buk/ μ L de ADN (en naranja).	76
Figura 14 A) Regresión lineal de la curva estándar obtenida para el gen but. El gráfico representa los Ct obtenidos de los duplicados de cada punto de dilución de la curva estándar. B) curvas de disociación obtenidas de los productos de amplificación	77
Figura 15 A) Regresión lineal de la curva estándar obtenida para el gen buk. El gráfico representa los Ct obtenidos de los duplicados de cada punto de dilución de la curva estándar. B) curvas de disociación obtenidas de los productos de amplificación.	77
Figura 16 Comparación del número de copias del gen butirato kinasa (buk) presentes entre el grupo de individuos control y pacientes infectados con VIH como resultados del análisis por q-PCR.	78
Figura 17 Análisis del número de copias del gen but encontrados entre el grupo de controles e infectados	79
Figura 18 Recuento global del número de copias de ambos genes observado en el total de muestras estudiadas ($p < 0.05$).	80

RESUMEN

La infección por el VIH afecta la integridad del funcionamiento del sistema inmune con repercusiones en la arquitectura composicional de la microbiota intestinal. Estas perturbaciones producen eventos de traslocación microbiana que tienen desagradables consecuencias en los pacientes.

En el presente trabajo se realizó un estudio observacional y transversal para evaluar los cambios en la microbiota intestinal de individuos infectados con VIH de la ciudad de Barranquilla, Colombia. Se analizaron 60 individuos por medio de secuenciación de la porción v3-v4 del gen rRNA 16S, y se cuantificó el número de copias de los genes bacterianos Butiril-CoA acetato-CoA-transferasa (*but*) y butirato kinasa (*buk*), relacionados con la producción de butirato, por PCR en tiempo real (q-PCR); 30 controles y 30 pacientes infectados; se tuvo en cuenta que los sujetos compartieran los mismos rangos de edad, estatus socioeconómico e índice de masa corporal.

Dada su naturaleza composicional, los datos provenientes de la secuenciación fueron normalizados usando Aitchison's Centered Log-Ratio. De forma general, se lograron identificar cambios en la estructura de redes de correlación en los pacientes infectados con VIH con respecto a los controles sanos, proporcionada por la herramienta SPIECEASI MB. Géneros tales como *Prevotella*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroides*, fueron relevantes en el grupo de individuos infectados con VIH. Al realizar un análisis discriminario de mínimos cuadrados parciales encontramos marcadores diferenciales representados por los integrantes de las familias Erysipelotrichaceae y Lachnospiraceae y los géneros *Catenibacterium*, *Roseburia*, *Dorea*. Todos ellos se caracterizan por producir ácidos grasos de cadena corta (AGC). Por esto se analizó la presencia de dos genes involucrados en la producción de AGC, *but* y *buk*. Aunque no se logró encontrar diferencias significativas entre los grupos, dentro del grupo de controles se logró observar un género bacteriano diferenciador, *Succinivibrio* que, de acuerdo a las recomendaciones realizadas por la FAO y el WHO puede tener propiedades probióticas, lo que lo convierte en un buen candidato para futuras investigaciones.

Palabras clave: Microbiota, VIH, 16S rARN, Bioinformática.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando intentamos descifrar un sistema, es importante entender sus partes y las relaciones que hay entre éstas, lo mismo podría aplicarse para lograr comprender el complejo del funcionamiento de muchos aspectos del cuerpo humano. Siguiendo esta presunción, se podría creer que con lograr catalogar y comprender el funcionamiento e interacción entre los componentes de nuestros distintos sistemas corporales (órganos, tejidos, células, nuestro ADN) tendríamos la capacidad de, en teoría, mejorar nuestra forma de prever y controlar la aparición de enfermedades y afecciones que pongan en riesgo nuestro bienestar. Sin embargo, la realidad es muy distinta, debido a que no estamos solos en nuestra constante lucha por la supervivencia, ya que según se ha demostrado ampliamente, desde tiempos inmemoriales hemos estado acompañados por trillones de organismos que, a pesar de ser tan pequeños, nos ayudan de formas muy versátiles; como por ejemplo, obtener energía a partir de los nutrientes que consumimos, sintetizar vitaminas esenciales, “entrenar” nuestro sistema inmune para que pueda defenderse de agentes patógenos mientras mantienen a raya a otros tantos. De manera que cuando alguna circunstancia los afecta, ya sea desequilibrando su estructura o destruyéndolos por completo, tendemos a presentar quebrantos de salud, como lo son malnutrición, obesidad, problemas neurológicos y hasta cáncer, por lo que es apenas lógico y de una importancia sustancial la relevancia del estudio y entendimiento de la constitución, funcionamiento y comunicación que estos “colegas” pueden tener con las distintas partes de nuestro organismo que es el lugar en donde habitan.

Lograr un entendimiento completo y absoluto de la estructura y comportamiento de la microbiota intestinal es un asunto complejo y delicado, dado que no hablamos de un órgano totalmente constituido, el cual tiene límites bien marcados; o en los cuales podríamos

identificar claramente sus funciones, alcances y en donde quizá podríamos identificar con relativa facilidad sus células constitutivas. En este caso hablamos de una inmensa comunidad de organismos, que además presentan una diversidad abrumadora, solo en el intestino se han logrado identificar al menos 780 especies distintas, una comunidad dinámica que, si bien, está delimitada por los distintos nichos corporales, la piel, boca, intestino, su capacidad de adaptación y variabilidad de nicho a nicho es considerable. Además, ésta presenta una variabilidad entre sujetos que dificultan los esfuerzos para lograr establecer un estado o un patrón común a una población o individuo dado.

El ecosistema intestinal es dinámico y las poblaciones que presenta están sujetas a diversos cambios, aunque en los adultos los filos Bacteroidetes y Firmicutes normalmente son los más predominantes en la microbiota; las magnitudes de estos cambios varían de acuerdo a distintos factores como lo son la edad, nuestra genética, la dieta, incluso la aparición de nuevas enfermedades o la invasión por otros microorganismos. Todas las condiciones conjuntas van generando cambios en nuestro organismo o directamente en la microbiota, los cuales pueden gestar no solo un cambio estructural sino funcional, que además puede desencadenar en la aparición de otras condiciones patológicas, algunas de ellas pueden consistir en enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad celíaca, enteropatía por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), diarrea aguda, diverticulosis, carcinoma y síndrome de colon irritable, todos ellos asociados a perturbaciones a nivel de las paredes de la mucosa intestinal.

Es importante resaltar que una de las propiedades de este conglomerado de microbios es su resiliencia, es decir la capacidad de algunos grupos microbianos de mantenerse y repoblar el micro ecosistema, permitiendo regenerar el tracto intestinal hasta un estado casi idéntico al original (Faith, Guruge, & Charbonneau, 2013). Ésta es evidente por la forma con la cual la microbiota se reconstituye con relativa rapidez una vez es inoculada con bacterias

típicas de un intestino “sano”, pero esto también aplica al aspecto negativo del asunto, es decir, cuando hay una perturbación por infección y esta es combatida por antibióticos, se establecen condiciones que favorecen el desarrollo de microbios nocivos, y estos también presentan esta obstinación dificultando su erradicación.

Por otro lado, es de particular importancia cómo ciertas condiciones modifican la estructura y el comportamiento de la microbiota. Muchas circunstancias ajenas al individuo, refiriéndose a aspectos distintos de la carga genética del individuo, pueden y logran efectuar cambios importantes en la dinámica poblacional, que pueden desembocar en la aparición de nuevas patologías o la severidad de otras preexistentes como en la que está enfocada este estudio: el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

El VIH es un lentivirus que está asociado al desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el cual es un detrimento progresivo del sistema inmunitario que condesciende en la susceptibilidad del individuo a ser infectado o atacado por organismos oportunistas o por aquellos que en condiciones normales resultan benéficos o inclusive necesarios para un buen funcionamiento y mantenimiento de la salud. Este deterioro de nuestro sistema de defensa corporal, se debe a que el virus tiene una afinidad orientada principalmente un grupo de células que hacen parte del mismo, como lo son los linfocitos T CD4+, macrófagos y células dendríticas. Cada una con una función característica dentro del bien orquestado sistema inmune. Las células T CD4+, denominadas “ayudadoras”, cumplen un papel similar al de un director de una sinfónica, organizando y mediando la respuesta inmune requerida en un momento determinado, su intensidad y duración en el tiempo. De ahí su vital importancia en el funcionamiento y de la misma manera la gravedad del impacto creado por su destrucción a causa de la infección viral.

La relación entre el VIH y la microbiota intestinal es muy marcada, dado que el lugar

de mayor impacto es en el interior de la mucosa asociada a tejido linfático, el cual funciona como un bastión de reclutamiento y entrenamiento para el grueso de nuestras células de defensa, tales como los linfocitos T CD4+ CXCR5, linfocitos Th17 y macrófagos. La acción desequilibrante del virus en acción entra en juego al empezar a disminuir las cantidades de células de defensa, lo que conlleva a una disminución en las concentraciones de péptidos antimicrobianos, IgA, importantes para el control y monitoreo de la tolerancia y la activación inflamatoria intestinal. Este desequilibrio perturba el balance en la competencia que existe entre las bacterias comensales, que suelen ser beneficiosas para nosotros, y otros agentes patógenos, permitiendo la proliferación de bacterias nocivas e incrementando la respuesta inflamatoria intestinal.

Otro aspecto importante que se abordó en el presente trabajo fue observar si hay cambios en las concentraciones de dos genes bacterianos asociados a la producción de ácido butírico o butirato. Hay sustancias que presentan actividad reguladora de la respuesta inmune provenientes del lumen intestinal, algunas de estas son los lipopolisacáridos, fragmentos proteicos como la flagelina, o provenientes del metabolismo bacteriano como el butirato. A este se le atribuyen algunas propiedades como: servir como principal fuente de energía de los colonocitos (Donohoe et al., 2011), que son las células constitutivas de las paredes de la mucosa intestinal; ser capaz de funcionar como interruptor molecular para regulación de la expresión génica ya que inhibe las histonas deacetilasa tipos 1 y 2 induciendo de gran manera la expresión génica del viroma de VIH y facilitando su replicación (Das et al., 2015)

La finalidad de esta investigación es lograr identificar los cambios en la estructura composicional de la ecología microbiana, a través de la determinación de grupos con mayor capacidad diferenciadora, estos a su vez se compararon con los resultados de la cuantificación de la presencia de los genes *but* y *buk*, para observar si los cambios en las concentraciones de

estos genes pueden permitir discriminar o diferenciar los grupos analizados. Esto se logra usando los análisis discriminatorios como el sPLS-DA que nos permiten clasificar los grupos bacterianos de acuerdo a su desempeño con una finalidad predictiva. Además de esto, se realizó el análisis de los grupos obtenidos y se estudiaron las características de cada género encontrado para buscar candidatos con potencial probiótico para el desarrollo de nuevos restauradores de microbiota intestinal, mejor orientados a nuestra idiosincrasia intestinal y genética.

Todo esto fue logrado gracias al avance de tecnologías como la secuenciación de última generación, la cual permite ahondar en el estudio de estos microhábitats en donde predominan microorganismos no cultivables y donde se pueden encontrar organismos con importancia biotecnológica, así como oportunistas que representan un riesgo para la salud de pacientes infectados con el VIH.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Definición del problema

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) produce una enfermedad mayor que ha afectado a más de 35 millones de personas a nivel mundial y es una de las enfermedades para las cuales se están haciendo inmensos esfuerzos para tratarlas y prevenirlas desde su aparición. Un mejor entendimiento de la interacción entre la microbiota intestinal, la infección con VIH y la respuesta inflamatoria presentada en el intestino, podría permitir trabajar en el desarrollo de mejores estrategias de prevención y tratamiento temprano. Se sabe que cuando la homeostasis de nuestro cuerpo se ve perjudicada o alterada, lo es a su vez la estructura de la microbiota intestinal. Debido a esto es necesario poder encontrar microorganismos, o grupos de éstos, que permitan servir como “indicadores”, los cuales puedan darnos un indicio del nivel de gravedad o el grado de afectación que presenta la población microbiana y, de esta forma, intentar relacionar ésta con el avance de la enfermedad que provoca dicha perturbación. Pero para lograr esto debemos conseguir analizar la estructura de la microbiota y la naturaleza de los cambios en poblaciones presentes durante el curso de la enfermedad en busca de factores determinantes y además lograr identificar las bacterias que posiblemente orquestan esa respuesta característica y cuál es su grado de relevancia o protagonismo en el proceso inflamatorio. Por lo que surge nuestra pregunta problema ¿es posible identificar géneros o familias bacterianas que puedan ayudar a diferenciar el grado de inflamación en el intestino de pacientes infectados con VIH y relacionarlas con la producción de ácido butírico intestinal?

Las comunidades microbianas que habitan en el intestino humano presentan una diversidad y una capacidad de adaptación y variabilidad impresionantes (Vital et al., 2013). Estas características dependen en gran medida de la interacción entre dichos microorganismos y la economía humana en la que habitan, lo que le confiere una alta complejidad y actividad metabólica (Salas & Chang, 2014). En este ecosistema microbiano hay organismos que resultan beneficiosos e incluso aquellos con importancia funcional y reguladora cuyo alcance logra afectar por completo el equilibrio y normal desempeño del ser humano (Consolandi et al., 2015; Guarner & Malagelada, 2003).

El impacto de la microbiota intestinal es un fenómeno altamente estudiado, en la actualidad se sabe que esta está involucrada en la protección del hospedero contra bacterias patógenas, contra las cuales compiten por alimento; la producción de nutrientes, como las vitaminas y los ácidos grasos de cadena corta (AGC), y el moldeamiento y regulación indirecta de nuestro sistema inmune a través de la producción de metabolitos bacterianos (ácido butírico, lipopolisacáridos, etc.) (Salas & Chang, 2014). La capacidad reguladora proporcionada por los metabolitos bacterianos en el intestino es un aspecto de mucha relevancia clínica e investigativa (Ramírez-Farías et al., 2009). Se ha demostrado en ratones libre de microorganismos que, sin éstos, se incrementa la mortalidad y la susceptibilidad frente a infecciones, además de otros padecimientos clínicos. Las características de las comunidades microbianas pueden modularse por medios dietarios, y a su vez también por procesos inflamatorios del hospedero (Kabeerdoss, Shobana Devi, Regina Mary, & Ramakrishna, 2012). La composición típica de estas poblaciones normalmente corresponde a integrantes de los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. El filo más abundante *Firmicutes* incluye miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium* (van Nood et al., 2013). Entre las sustancias con actividad importante en el intestino, se pueden mencionar los

AGC, particularmente el ácido butírico, cuya actividad, entre otras, está relacionada con la diferenciación de células T reguladoras, lo cual tiene un serio impacto en la enfermedad intestinal inflamatoria (Guarner & Malagelada, 2003; Hippe et al., 2011).

Según el reporte de progresos del GLOBAL HIV/AIDS RESPONSE del 2011, emitido por la OMS y la Unicef, se estima que aproximadamente habían 35 millones de personas viviendo infectadas con VIH en el 2010 (Salas & Chang, 2014), y se registran aproximadamente 2.7 millones de nuevos casos cada año, aun cuando la OMS registra que la incidencia ha estado disminuyendo gradualmente las cifras siguen siendo de bastante consideración. Teniendo esto en cuenta, es evidente la importancia de lograr obtener más información acerca del papel que cumple la microbiota en la transmisión y la patogénesis (WHO, 2011).

Se sabe que la microbiota de un paciente infectado con VIH presenta una serie de alteraciones en su conformación. Estos cambios pueden estar relacionados con la prevalencia de un cuadro inflamatorio crónico de la mucosa intestinal (Jiang et al., 2009). Al analizar las poblaciones, se denota un incremento en las *Proteobacteria* y una disminución de las *Firmicutes*, de igual manera se ha logrado observar la proliferación de *Prevotella* junto con un detrimento en las poblaciones de *Bacteroidetes*. Todos estos cambios repercuten en las poblaciones de células inmunitarias incrementando la activación de células T del colon y además de las células dendríticas (Atarashi et al., 2011; Salas & Chang, 2014).

Toda esta serie de cambios puede a su vez generar un impacto en el progreso de la infección con VIH, pero debido a que la microbiota intestinal es muy diversa y produce muchos tipos distintos de metabolitos importantes, no se ha esclarecido de forma clara cómo estas sustancias afectan o no el transcurso de la enfermedad. De igual forma, se desconoce

cuál es la dependencia o reciprocidad de la respuesta inflamatoria con respecto al cambio en las concentraciones de metabolitos de interés.

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la microbiota intestinal ha expandido nuestra forma de entender las formas en que se relacionan los microorganismos que nos habitan y los distintos factores que pueden llegar a causar patologías. Gracias a los avances en el campo de la secuenciación podemos llevar nuestras investigaciones más lejos e identificar nuevos organismos bajo condiciones que antes resultaban dignas de una historia de ciencia ficción. Estos esfuerzos que han permitido crear un gran banco de información correspondiente a la estructura microbiana intestinal son llevados a cabo principalmente en Europa y Estados Unidos, en donde desafortunadamente, la participación latinoamericana es mínima, dejando un gran vacío que se incrementa con las diferencias dietarias y de acervo genético las cuales se espera generen diferencias en el consolidado microbiano intestinal. Estas diferencias se vuelven fundamentales cuando se tiene en cuenta que los cambios en la estructura de la microbiota intestinal tiene un papel importante en el desarrollo de diversos cuadros patológicos (Falony et al., 2016). Entre ellas se encuentra el VIH, el cual ha causado más de 35 millones de muertes por lo que es muy importante entender las distintas complicaciones de salud que derivan la infección. El estudio de los cambios en la microbiota durante el curso de la infección por VIH es particularmente importante, dado que el virus tiene un efecto devastador en los tejidos linfáticos asociados a las mucosas (MALT por sus siglas en inglés). Este lugar es clave debido a que es donde se da la comunicación entre el epitelio intestinal, el sistema inmune y el ecosistema bacteriano. Lograr identificar los principales actores presentes en la microbiota durante el curso de la infección por VIH es fundamental porque el ecosistema intestinal es un ente regulador de mucho potencial, ya que se ahí pueden partir nuevas estrategias para

restablecer el equilibrio del ecosistema intestinal, fortalecer la respuesta inmune del hospedero o hallar grupos bacterianos con facultad para desarrollar nuevos fármacos.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo General*

Determinar si la infección por VIH genera cambios en la estructura de la microbiota bacteriana intestinal e identificar bacterias cuya abundancia es diferencial entre individuos infectados y controles sanos.

4.2. *Objetivos Específicos*

Establecer si se presentan discrepancias en la diversidad (Alfa y beta) de la microbiota intestinal presente en muestras de heces de individuos sanos y pacientes infectados con VIH.

Identificar géneros o familias bacterianas que permitan caracterizar la disbiosis microbiana en el contexto de la infección por el VIH.

Seleccionar, basado en la literatura, genes bacterianos que expliquen, desde el punto de vista funcional, el impacto en la microbiota y explorar si la carga de estos genes es diferencialmente abundante entre pacientes infectados y controles sanos.

Proponer bacterias que presenten una abundancia diferencial dentro del grupo de controles sanos y que, de acuerdo a la literatura, tengan potencial probiótico para uso terapéutico y profiláctico.

5. ESTADO DEL ARTE

5.1 *Características Del Virus*

El Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un integrante de la familia de los retrovirus, pertenece al género de los lentivirus. Este virus provoca una disminución rápida y progresiva en los recuentos de células T CD4+, qué, junto con los macrófagos son las células diana principales del virus, los cuales generan inmunodeficiencia y eventualmente el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Deeks, Tracy, & Douek, 2013; Esteban, 2014).

Dicho virus, que fue identificado como el causante del SIDA en 1984 (Esparza, 2013), ha provocado la muerte de alrededor de 36 millones de personas y que hasta el 2013 otros 35 millones continúan infectados (Sankoh, Arthur, Nyide, & Weston, 2014), ha logrado extenderse en casi todos los países del mundo. Sin embargo, y aunque la incidencia de la enfermedad ha disminuido cerca de un 19% desde el año 1999 (WHO, 2011), todo esto gracias a la implementación de medidas preventivas a escala mundial, se debe reconocer que las cifras que corresponden a casos nuevos sigue siendo alta, pues se estima que cada año se infectan 2.7 millones de personas (Girard, Osmanov, Assossou, & Kieny, 2011). Otro aspecto que debe tenerse en cuenta son los avances en las terapias antirretrovirales, que logran disminuir la tasa de mortalidad de forma significativa, pero a su vez han permitido que la cantidad de personas que viven en la actualidad con la infección haya aumentado considerablemente (Montúfar Andrade et al., 2015). Según la actualización global epidemiológica de 2011, solo en Latinoamérica se presentó un incremento de 1.3 millones en el año 2001 a 1.5 millones en 2010 (WHO, 2011).

Según los reportes del Ministerio de salud y protección social, se estima que en el 2011 se encontraban alrededor de 129.630 personas infectadas con VIH en Colombia y, que para ese mismo año se reportaron alrededor de 7991 casos nuevos o muertes relacionados con VIH/SIDA (Montúfar Andrade et al., 2015). En el año 2013, el boletín epidemiológico “Situación del VIH/Sida Colombia 2013” encontró que la incidencia por cada 100.000 habitantes de casos notificados en los distintos departamentos y ciudades durante el año 2012 presentaba la proporción más alta en la ciudad de Barranquilla con un 50,6, seguido por Quindío 28,4; Cartagena con 37,6; Valle 24,0 y Risaralda 27,5. En ese mismo año, ingresaron al SIVIGILA un total de 8.196 casos infectados y se reportaron 2.216 muertes asociadas con VIH/sida. Por otro lado, se encontró una prevalencia de 0.50 %, estimando un total de 122.197 personas infectadas con VIH.

El VIH es un virus envuelto, con un diámetro aproximado de 100 a 200 nm, cuyo genoma se constituye de dos copias de ARN positivo de cadena sencilla de aproximadamente 9,5 kb, el cual codifica las proteínas virales estructurales como la *Gag*, que una vez cortada produce las proteínas de la matriz (p17), la cápside (p24) y nucleocápside (p7); la proteína *Pol*, que al auto escindir se produce una proteasa (PR), la transcriptasa reversa (RT) y una integrasa (IN), y la proteína *Env*, que es una glicoproteína de envoltura que se encuentra anclada a la membrana y que luego de escindida forma la subunidad externa de la gp120 y una unidad transmembrana gp41, las cuales forman las espigas triméricas en la superficie del virión que permiten la interacción con receptores celulares y también están involucradas en la evasión inmune (Delgado, 2011).

Entre otras proteínas virales el genoma codifica la *Tat*, *Rev* y proteínas accesorias como la *Nef*, *Vif*, *Vpr* y *Vpu*. El gen *Tat* codifica una proteína que previene la transcripción temprana de las nuevas copias de pro virus generados, uniéndose al extremo 5' de dichos ARNm, lo que la hace fundamental en la replicación viral. El gen *Rev* cifra una proteína que permite el transporte de los ARNm del núcleo al citoplasma permitiendo la expresión de proteínas como la *Gag*, *Pol* y *Env*. El gen *Nef*, es un factor de virulencia que induce la apoptosis en las células T CD4+, *Vif* que es una enzima que previene la desactivación del genoma viral al promover la degradación de un factor mayor de inmunidad celular como lo es el APOBEG3G. La *VPR* induce el secuestro celular en G2 y además mejora la replicación en macrófagos, facilitando el transporte al núcleo del complejo viral inmediatamente después de la entrada. Por último, la *Vpu* es la encargada de permitir la degradación del CD4 viral y además facilitar la liberación de los viriones desde la superficie de la célula infectada (Girard et al., 2011).

El VIH, como muchos virus envueltos, ingresa a la célula por medio de la fusión de la envoltura viral y la membrana celular. En el caso particular del VIH, la subunidad gp120 que conforma el conjunto meta-estable de la glicoproteína gp120-gp41, y que en conjunto construyen las estructuras en forma de espinas en la envoltura viral, se une al receptor CD4 en la superficie de la célula objetivo (Yang, Kiessling, Simmons, White, & Tamm, 2015). Esto genera un cambio conformacional en los receptores de quimosinas presentes en gp120, lo cual permite una interacción adicional con CCR5 o CXCR4, que funciona como correceptor (Delgado, 2011). Cuando ya la partícula viral se haya “anclada” a la membrana, se produce un cambio tridimensional en gp41 permitiendo la exposición del péptido de fusión en su porción n-terminal el cual se inserta como un arpón en la membrana celular, formando un complejo semi estable de 6 hélices (Esté & Telenti, 2007), y es en este momento cuando una

porción intermedia de gp41 se pliega sobre sí misma, tomando forma de horquilla y buscando una configuración más estable, obligando el acercamiento y fusión de las membranas (Klasse, 2012).

5.2 Impacto Inmunológico

Aun cuando el VIH se ha estudiado extensivamente todavía no se ha podido desarrollar una vacuna efectiva que prevenga la infección o detenga el progreso de la enfermedad. Sin embargo, se han diseñado terapias con antirretrovirales, cuya función es inhibir la replicación del virus ayudando a restaurar eventualmente la situación inmunológica del paciente con miras de eliminar el riesgo de establecer complicaciones que permitan la aparición del SIDA (Deeks et al., 2013).

Una vez el virus ingresa en el cuerpo se evidencia su acción en los primeros días; ya que se asocia a una liberación intensa y agresiva de una variedad de citoquinas (como el interferón α , interferón γ , interleucina 6, 10, 15, factor de necrosis tumoral) (Deeks et al., 2013; Esteban, 2014). Todo esto genera una respuesta de resistencia frente al agente viral, pero a su vez genera una alta activación de los linfocitos CD4 y CD8, lo que hace que a su vez se genere una condición inflamatoria; dicha respuesta aguda está acompañada de la generación de anticuerpos dirigidos a la glicoproteína 41 (gp-41) pero que carecen de actividad neutralizante (Williams et al., 2015). El mayor obstáculo que enfrenta nuestro sistema inmunológico para combatir la infección por el VIH es la alta variabilidad que producen eventos como el proceso de retro transcripción, el cual tiene una tasa de error relativamente alta, 1 de cada 10^4 nucleótidos, y que teniendo en cuenta que una vez iniciada la maquinaria celular esta puede

producir alrededor de 10^{10} - 10^{12} partículas virales diarias lo que implica un aumento en las probabilidades de cambios de posición en la secuencia genómica. Estos cambios de posición en la secuencia genómica hacen que el virus inicial “fundador” alcance un número alto de mutaciones en poco tiempo, generando cuasi-especies, las cuales con sus distintas variaciones pueden permitir una selección mejorada de variantes con características que les pueden otorgar ventajas a la hora de evadir con éxito la respuesta inmune del hospedero. Otra particularidad es la bastante frecuente infección con más de una variante del virus en una misma célula, lo cual dispara las probabilidades de recombinación dada la relativa facilidad de que esto suceda (Girard et al., 2011). Aquellos que padecen una infección primaria por el virus pueden ser asintomáticos por largos periodos de tiempo, o tener síntomas inespecíficos por algunas semanas o incluso meses, por ejemplo; sarpullido, fiebre, diarrea, artralgia, mialgia, náuseas, dolor de garganta, estado de somnolencia profunda y prolongada, dolor de cabeza o rigidez en el cuello (Strauss & Strauss, 2002).

Luego de que se ha establecido una condición de activación de células T hiper-reactiva “estable”, cuyo origen está dado por distintos factores como lo son: la replicación continua del virus, la acción de otros patógenos, fallas en los factores regulatorios del proceso inflamatorio o la disrupción de la mucosa intestinal mediada por el VIH, exponiendo de forma prolongada el tejido de las mucosas a antígenos microbianos que pueden llevar a inducir una respuesta inflamatoria crónica (Esteban, 2014); se produce una pérdida bastante importante de células T CD4, una fibrosis y finalmente en una falla de la capacidad regenerativa de los tejidos linfoides (Deeks et al., 2013). Todo esto aparentemente conlleva a un “agotamiento” o “envejecimiento” de las células T, consecuencia de la alta tasa de activación y diferenciación celular, las cuales se caracterizan por la falta de expresión de CD28 y un incremento de CD57,

lo que a su vez está relacionado con una progresión más rápida hacia el desarrollo del SIDA (Strauss & Strauss, 2002).

Aún con el advenimiento de los tratamientos con antirretrovirales, estudios recientes sugieren que alrededor del 80% de las personas infectadas con VIH padecen infecciones oportunistas (Siberry et al., 2013). En Colombia esa cifra alcanza a sobrepasar el 70% en algunas ciudades como Neiva, Cali y Bogotá, entre las cuales las patologías más frecuentes fueron: toxoplasmosis cerebral (52%), candidiasis mucocutánea (35%) y tuberculosis (Agudelo-González, Murcia-Sanchez, Salinas, & Osorio, 2015; Castiblanco & Ribón, 2006; Lizarazo, Castro, de Arco, Chaves, & Peña, 2006).

Con el agotamiento rápido y progresivo de los linfocitos T CD4⁺ presentes en la lámina propia se acontecen eventos que traen consecuencias catastróficas. Por un lado, la aparición de infecciones oportunistas debido a los bajos conteos de linfocitos T CD4⁺ y la pérdida de la inmunidad mediada por los mismos, lo que permite la aparición de enfermedades como toxoplasmosis, aspergilosis, candidiasis, tuberculosis y tumores como el sarcoma de Kaposi o el linfoma de células B (Lucas & Nelson, 2015). Por otro lado, la traslocación microbiana se considera una consecuencia indirecta de la acción del virus, que no es más que es la entrada de productos microbianos más allá de los límites establecidos por el epitelio. Esto es a causa de que se pierde la acción “vigilante” de los linfocitos Th17 llamados “ayudadores”, los cuales controlan la acción de bacterias presentes en las mucosas así como en el lumen intestinal (Nowak et al., 2015). Como resultado, distintos productos microbianos como los lipopolisacáridos pasan al torrente sanguíneo exacerbando la respuesta inflamatoria. Otro factor concomitante de la ausencia de linfocitos presentes es la pérdida de bacterias mutualistas que dependen de la interacción con el sistema inmune para poder establecerse en

el ecosistema intestinal; por ejemplo, *Bacteroides fragilis* que depende de la interacción que se presenta entre su polisacárido A capsular (PSA), que tiene capacidad immuno-moduladora (Surana & Kasper, 2012) y los linfocitos T CD4+. Este último, al ser presentado a los linfocitos T CD4+ los activa induciendo la diferenciación de células T CD4+ FoxP3, llamadas células T reguladoras o T reg, productoras de interleucina 10 (IL10) que tiene actividad antiinflamatoria. Es común encontrar una reducción de poblaciones de *B. fragilis* durante la infección por VIH, así como otras especies Clostridiales conocidas por inducir también la diferenciación de células T reguladoras (Lozupone et al., 2014b).

5.3 Papel de la Microbiota Intestinal

En 1905, el Dr. Elías Metchnikoff señalaba la importancia de los yogures y fermentos a base de leche para la prevención de lo que él denominaba la auto toxicidad del intestino grueso. Él sabía que ciertas bacterias por medio de la producción de ácidos contrarrestaban las bacterias perjudiciales (Preidis & Versalovic, 2009). Gracias a sus estudios, el Dr. Metchnikoff pudo concluir que no todos los microorganismos representan un riesgo para la salud humana y que quizá hasta podrían guardar parte del secreto de la longevidad. Por otro lado, Joshua Lederberg quien en el año 2001 acuñó el término “microbiome”, con el cual se refería a la “comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que literalmente comparten nuestro espacio corporal y que son factores determinantes de la salud y enfermedad”, se refería al conjunto de hospedero y parásitos como un “superorganismo”, los cuales pueden llegar a guardar una relación muy íntima, hasta el punto de especializar sus genomas en aras de una mejor integración que roza los límites de lo

quimérico (Lederberg & McCray, 2001). Cabe resaltar que el término “microbioma” en la actualidad se refiere más al conjunto de genes que corresponden a la comunidad microbiana, y “microbiota” es el término más frecuente al referirse a los microorganismos como tal.

La microbiota que habita un ecosistema específico puede estar compuesta por virus, bacterias o eucariontes unicelulares como algunos hongos y protozoos (D’Argenio & Salvatore, 2015). La microbiota del cuerpo humano está compuesta por una inmensa comunidad de estos microorganismos que habitan distintos nichos ecológicos (Álvarez, Peña, & Acosta, 2010). Desde esta perspectiva, el ser humano funciona como un “ambiente” habitable, tanto en la superficie como en el interior del nuestro cuerpo (D’Argenio & Salvatore, 2015).

Se ha reportado que un individuo “sano” promedio puede contener entre 500 y 700 distintas especies bacterianas en su intestino (Bengmark, 1998; Guarner & Malagelada, 2003). Muchas de estas especies tienen importantes funciones en nuestra salud. De hecho, no solo presentan una amplia diversidad, sino que además sus cantidades llegan a ser 10 veces mayores que la cantidad de células eucarióticas en nuestro cuerpo (Bengmark, 1998; Guarner & Malagelada, 2003; Pop, 2012).

Gran parte de esa población microbiana la adquirimos cuando al nacer, entramos en contacto con la microbiota vaginal y anal de la madre (Koenig et al., 2011), obteniendo un inóculo fundador durante la salida por el canal de parto, iniciándose un proceso de sucesión microbiana, en donde ciertos microbios colonizan distintos hábitats característicos en los múltiples períodos de tiempo de nuestra vida (Berg, 1996). Incluso, hay estudios en gemelos que muestran que hay cierto grado de heredabilidad en la forma en que nuestro cuerpo moldea y condiciona las poblaciones microbianas (Goodrich et al., 2014). Algunas de las especies

encontradas en pequeños infantes saludables son: *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, y *Actinomices*, *Lactobacilli*, *Ruminococcus* (ahora clasificada como *Blautia*) (Jenq et al., 2015; Preidis & Versalovic, 2009).

Estudios recientes han mostrado relación entre géneros bacterianos como *Roseburia*, *Ruminococcus* y *Akkermansia*, con altos niveles de transcripción de los genes *Irak4*, *Osbp* y *Ctnnb1*, respectivamente (Org et al., 2015). Cada uno de estos genes está involucrado con almacenamiento de grasa subcutánea, proteínas de transporte de lípidos y los complejos involucrados en el mantenimiento de la adhesión célula-célula. Todo esto nos ha dado indicios a través de la genética para entender un poco mejor la forma en la que nuestro cuerpo interactúa con la microbiota acompañante.

Pero más allá de entender algunas características de la microbiota como la resiliencia o su gran diversidad, es también importante saber diferenciar las limitaciones del alcance de un estudio de acuerdo a la población. Esto es, debido a que como se mencionó anteriormente, la comunicación existente entre la microbiota y el sistema que la contiene es bilateral, por lo tanto, hay que tener en cuenta al sujeto en la ecuación. Se deben tener en consideración también aquellas peculiaridades que condicionan de alguna manera la naturaleza y el comportamiento de la microbiota como lo son la genética del individuo (Org et al., 2015), la dieta o la ubicación geográfica (Shankar et al., 2017).

Aun cuando varios estudios muestran que la infección del VIH puede causar cambios y perturbaciones en la microbiota, un gran número de dichos estudios se han realizado especialmente en países occidentales desarrollados como EE. UU, en donde la dieta

predominante está basada principalmente en carbohidratos procesados, grasas saturadas y baja en fibras y carbohidratos complejos (Shankar et al., 2017).

Uno de los lugares en donde podemos apreciar claramente la importancia y el impacto del equilibrio simbiótico funcional de la microbiota y los sistemas complejos humanos, es en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés). Este tejido es un pilar esencial en el desarrollo y funcionamiento normal de nuestro sistema inmunológico (Nowak et al., 2015), a tal punto que distintos estudios han demostrado en ratones desarrollados bajo esterilidad completa, que al carecer o desarrollar tardíamente su microbiota, tienen fallas en el desarrollo de los tejidos linfoides asociados al intestino y, consecuentemente, presentan una respuesta inmune deficiente (Prince, Mandel, Nadeau, & Singh, 2015), puesto que la interacción bacteria–humano en el intestino ayuda a estimular el desarrollo de células gliales entéricas de la mucosa intestinal (Kabouridis et al., 2015), a la diferenciación de células Th reguladoras, proveyendo de metabolitos importantes a las células presentadoras de anticuerpos, como lo son los AGC (butirato, acetato) o lipopolisacáridos. Los AGC en escenarios normales promueven la tolerancia inmunológica, además de participar en procesos metabólicos como son: la fermentación de residuos no digeribles por nosotros, producción de vitamina K, facilitar la absorción de iones, aminoácidos y crear un efecto de protección al competir contra otros organismos patógenos (Guarner & Malagelada, 2003).

Es aquí donde se ven algunos de los principales efectos de la infección por el VIH, y que tienen un impacto tanto en la microbiota intestinal como en la salud de los pacientes afectados. En la etapa de infección aguda, el virus comienza destruyendo rápidamente las células T CD4+, lo cual reduce el efecto “regulador” que estas tienen sobre las poblaciones de bacterias en el lumen intestinal (Lozupone et al., 2014a), por otro lado, y de manera

simultánea, en las mismas etapas tempranas de la infección, cuando el cuerpo reacciona, y nuestro sistema inmune empieza a sintetizar anticuerpos para tratar de combatir, se generan anticuerpos contra la proteína gp41 de la envoltura del virus (Williams et al., 2015); sin embargo, estos anticuerpos resultan no ser neutralizantes contra el VIH, pero sí afectan proteínas bacterianas como la ARN polimerasa presente en la microbiota y que interfiere generando una disbiosis, cuya consecuencia es la disrupción de la mucosa y la lámina propia. Este fallo en la permeabilidad tiene como consecuencia la traslocación de bacterias y demás metabolitos (Guarner & Malagelada, 2003), que incrementan los estados inflamatorios desencadenados y que se mantienen de forma crónica en los pacientes infectados.

5.3.1 Importancia de los Metabolitos Bacterianos

Múltiples estudios han dado indicios de la muy cercana relación entre la microbiota y distintas patologías, entre ellas eccema, problemas cardiovasculares, Alzheimer y hasta el VIH; estudios en donde se ha visto que no solo la turbación de la microbiota condiciona enfermedades sino, que las patologías a su vez provocan cambios significativos en las poblaciones microbianas, las cuales pueden llegar a agravar la condición presente (Marchetti, Tincati, & Silvestri, 2013). Resulta particularmente interesante y, por lo tanto, motivo de investigación, la relación existente entre la infección por virus de la inmunodeficiencia humana y la microbiota humana. Es al menos intrigante, dado que muchos estudios, en los que comparan las poblaciones microbianas de pacientes infectados contra las de personas sanas, han mostrado perturbaciones de la microbiota en distintos lugares corporales (oral, vaginal, intestinal) (Salas & Chang, 2014) resultado de la infección por el VIH. Hay que tener en cuenta, que más allá de notar los cambios hay que preguntarse: ¿Qué repercusiones tiene esto en la salud de los pacientes?

Para el estudio de las perturbaciones en la comunicación bilateral presente entre el complejo sistema que representa la mucosa intestinal y la comunidad microbiana, cuya variabilidad es tan abrumadora como su estabilidad (Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson, & Knight, 2012), se pueden abordar varias aproximaciones, una en la cual se observan los cambios en la estructura poblacional, en dónde se tienen en cuenta los cambios en las proporciones de las familias y géneros bacterianos presentes en aras de predecir o al menos relacionar el transcurso de un padecimiento con dichos cambios (Petrić et al., 2011). Esta tarea es ardua, ya que, aunque se sabe que la microbiota intestinal en el adulto tiene un comportamiento más o menos estable, presenta algunas variaciones en torno a un llamado “core” microbiano (Turnbaugh et al., 2009). Otro acercamiento es el estudio de los metabolitos o sustancias producidas por los complejos metabólicos constituidos en los microorganismos que colonizan la mucosa intestinal. Algunos de los metabolitos que han sido foco de mucha investigación están relacionados con su capacidad de estimular algún tipo de respuesta por parte del sistema inmune, como los lipopolisacáridos presentes en la pared celular de las bacterias Gram negativas (Xiao & Zhao, 2014) y otros como AGC que proporcionan energía a células epiteliales intestinales (Donohoe et al., 2011).

5.3.1.1 Ácidos grasos de cadena corta.

Los ácidos grasos de cadena corta (AGC) como el acetato, butirato y propionato, son productos del metabolismo anaerobio de las bacterias comensales intestinales. Estos se encuentran entre los metabolitos más abundantes en la porción más proximal del colon

llegando a concentraciones de 70 a 140 mM (Nastasi et al., 2015). Algunos sustratos para su fermentación suelen ser la celulosa, hemicelulosa, pectina y residuos de fibra no digerida.

Los AGC son ácidos débiles con un pKa de 4.79, 4.87 y 4.81 correspondiente al acetato, propionato y butirato respectivamente. Dado que en el lumen intestinal se encuentra principalmente en su forma ionizada, requiere un consumo equimolar de iones H^+ para su transporte. Estos pueden provenir 3 posibles fuentes; la ingesta directa H^+ , la disociación de bicarbonato y del intercambio $Na^+ - H^+$ o transporte activo de $K^+ - H^+$. Debido al impacto dinámico en el balance iónico en el lumen intestinal, la inhibición de los AGC se relaciona con el desarrollo de diarreas, disminución en la absorción de sodio y agua (Wong, de Souza, Kendall, Emam, & Jenkins, 2006).

Las células del epitelio intestinal usan al menos 3 sustratos como fuente de energía, glutamina luminal, glucosa, pero principalmente y en mayor medida de AGC provenientes del lumen del colon (Wong et al., 2006). La contribución energética, particularmente del butirato, en el metabolismo de las células del colon sigue una ruta de oxidación que va del butirato, al acetato hasta el propionato.

Las perturbaciones en los niveles de AGC, particularmente butirato, han sido asociadas a enfermedades intestinales crónicas. Observaciones en pacientes con colitis ulcerativa permite proponer que el efecto terapéutico del butirato es debido a que, al funcionar como combustible celular de los colonocitos, permite reactivar la síntesis proteica y permitir la sanación (Frankel et al., 1994).

Las poblaciones asociadas a la producción de butirato en el intestino humano son Clostridiales de los grupos IV y XIVa. Las enzimas relacionadas más comúnmente en la etapa final de su formación son la butiril-coenzima A (CoA): acetato CoA transferasa (*but*) y, en menor medida, butirato kinasa (*buk*) (Levine, Looft, Allen, & Stanton, 2013).

Además de servir como fuente de energía, el butirato influye directamente la expresión génica del hospedero al inhibir la acción de la histona deacetilasa, interfiere en la señalización pro inflamatoria lo cual hace que tenga una muy alta actividad inmunomoduladora. Ensayos in vitro se ha observado la disminución de la expresión de las citoquinas IL-6 y IL-12 factores de la respuesta inmune innata en macrófagos y células dendríticas (Iraporda et al., 2015).

En el contexto de la infección con VIH los AGC son motivo de controversia. En la actualidad hay quienes asocian los AGC con la reactivación de HIV latente en el genoma o episomas de células infectadas (Imai, Yamada, Tamura, Ochiai, & Okamoto, 2012). También debido a su acción antiinflamatoria los AGC pueden reducir la diferenciación de células T reguladoras, las cuales suprimen la actividad de las células T CD8+. Las células T CD8+ citotóxicas son fundamentales en el control de las infecciones virales, por lo que su inhibición tiene consecuencias negativas en el desarrollo de la infección (Dietze et al., 2013).

Por otro lado, hay evidencias de que una reducción significativa en la producción de AGC durante la infección con VIH está asociada a un incremento en cuadros infecciosos crónicos que perturban el equilibrio en la mucosa intestinal y causan un aumento en la traslocación microbiana, lo que genera un estímulo para la activación de nuevas células T CD4+ que a su vez serán víctimas de la infección por el virus teniendo como consecuencia un cuadro inflamatorio más severo (Vázquez-Castellanos et al., 2015)

5.4 Uso de microorganismos de origen intestinal en el desarrollo de productos terapéuticos.

El uso de microorganismos para nuestro beneficio es una práctica de la humanidad que se remonta a hace más de 3000 años, cuando los sumerios empezaron a fermentar cereales para

producir bebidas alcohólicas (Maksoud, El Hadidi, & Amer, 1994) luego los griegos y romanos, quiénes recomendaban el consumo de leche fermentada para la producción de quesos y además afirmar que era buena para la salud (Ozyurt & Ötles, 2014). Pero el primer acercamiento científico fue realizado por el zoólogo Ilya Ilyich Mechnikov en 1907, quién además de sus inmensos aportes a la inmunología con el descubrimiento de los macrófagos y su papel en la respuesta inmune, propuso que el consumo de leche fermentada tiene efectos positivos en lo que él llamaba “autointoxicación intestinal” (Gismondo, Drago, & Lombardi, 1999).

Estudios desarrollados entre el año 2004 y 2006 han mostrado la importancia de los distintos procesos biológicos encriptados en la enorme diversidad presente en la microbiota intestinal, todo esto respaldado y promovido por el desarrollo de tecnologías que permiten estudiar estos microorganismos, muchos de ellos no cultivables. La financiación por parte del NIH (National Institutes of Health) de 170 millones de dólares y de otras organizaciones públicas y privadas por 290 millones han ayudado a avanzar más rápidamente, aumentando considerablemente las publicaciones desde el 2002 hasta el 2010 hasta 10 veces (Fallis, 2013). Muchos de estos estudios prometen respuestas a diversos problemas en la salud humana como el autismo, Parkinson, enfermedad intestinal crónica, infección con *Clostridium difficile* y el VIH.

5.4.1 Probióticos

El término “probiótico” para describir un aditivo o suplemento alimenticio que mejora la salud del hospedero fue utilizado inicialmente en 1974 por R.B. Parker de una forma aproximada a la que se usa hoy. Según la “Consulta conjunta de expertos de la FAO/OMS

sobre la evaluación de las propiedades nutricionales y de salud de los probióticos en Alimentos, incluyendo leche en polvo y bacterias lácticas vivas”, emitido por la Organización De Alimentos Y Agricultura De Las Naciones Unidas (FAO, por sus siglas en inglés) los probióticos se definen como “organismos vivos que cuando administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio al hospedero” (WHO, 2001).

Alguno de los beneficios atribuidos a los probióticos son: reducción de la irritación del colon, estreñimiento y diarreas agudas, inhiben el crecimiento de otras bacterias patógenas, mejoran la síntesis de vitamina B (Preidis & Versalovic, 2009). Sin embargo, aún falta más investigación para alcanzar a vislumbrar el alcance de este impacto benéfico en la salud del individuo.

Aun cuando se tiene una definición clara de lo que es un organismo probiótico, hay unos requisitos muy particulares que un organismo debe cumplir para ser considerado probiótico. Entre esos criterios se incluyen: posible reproducción a gran escala; viabilidad y estabilidad durante su almacenamiento; habilidad para sobrevivir el ecosistema intestinal (Gismondo et al., 1999). Algunas consideraciones adicionales propuestas por la FAO y WHO son: resistencia a la acidez gástrica; resistencia a los ácidos biliares; adherencia a las mucosas o a las células epiteliales humanas; actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas; habilidad para reducir la adhesión de patógenos a superficies; actividad hidrolasa contra las sales biliares; resistencia a espermicidas, en el caso de probióticos de uso vaginal (Araya et al., 2002).

Los principales organismos utilizados para el desarrollo de productos probióticos pertenecen a los géneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces*, pero no se restringe a estos, ya que continuamente se exploran nuevas consideraciones de acuerdo a la relevancia biológica, la salud humana y el tipo de probiótico a desarrollar.

Además del uso microorganismos otras estrategias se están estudiando, como el trasplante fecal (FMT, por sus siglas en inglés) o el dispositivo llamado “Robogut”, diseñado por la doctora Emma Allen-Vercoe, y que se compone de una serie de reactores desarrollados en Ontario, Canadá en el año 2013, el cual simula las condiciones intestinales y permiten el aislamiento de al menos 33 tipos de bacterias que luego pueden usarse para para construir un inóculo intestinal llamado “rePOOPpulate”, el cual se comporta como un FMT pero de origen artificial, y que está pensado para el tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*, que causa una seria y recurrente infección que produce intensas diarreas, (Petrof et al., 2013). La relevancia de este tipo de dispositivos y tratamientos es que a pesar de que hoy día hay productos y tratamientos para la diarrea crónica que se supone ayudan a combatir este tipo de afecciones, estos productos que tienen esporas o concentrados de microorganismos y cuya finalidad es reconstituir la microbiota intestinal, en realidad no tienen una adherencia terapéutica; es decir, aun cuando las bacterias “buenas” o “beneficiosas” cumplen su objetivo de restaurar y ayudar en la disminución de la inflamación intestinal, su efecto no es perdurable. Iniciativas como esta y otras aún más elaboradas como las avidocinas, que son moléculas con acción antibiótica selectiva diseñada para tratar enfermedades que atacan y destruyen los microbios deseados mientras, no afectan a las bacterias comensales benéficas, que normalmente son erradicadas sin conmiseración por los fármacos actuales, buscan aprovechar su potencial terapéutico latente (Garber, 2015).

La industria de los probióticos promete producir al menos 46.55 billones de dólares para el año 2020, y está dominado principalmente por la industria alimenticia, compañías de suplementos alimenticios y empresas dedicadas a la producción de probióticos (O’Toole, Marchesi, & Hill, 2017). Datos de Gran Bretaña indican que allí unos dos millones de británicos los consumen a diario lo que implica un mercado anual de 135 millones de libras

esterlinas. En Colombia, no existen estadísticas claras. Sin embargo, los probióticos se consiguen hoy, en todos los mercados.

Tabla 1 Listado de productos restauradores de la microbiota intestinal de venta en territorio colombiano

PRODUCTO	MICROORGANISMO	CONCENTRACIÓN
Enterogermina	<i>Bacillus clausii</i>	2 billones de UFC
Floratil	<i>Saccharomyces boulardii</i>	200 mg de células liofilizadas
Lactipan	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	entre 667 mil y 1000 millones de UFC
Bifidolac	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5.000 millones de
Ecosys	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bifidus</i>	
Eptavis	<i>Streptococcus salivarius subesp. Thermophilus</i> , <i>Bifidobacterias (breve, infantis, lungum)</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus</i> , <i>Streptococcus faecium</i>	entre 7 millones y 48 billones de UFC
Fermolac	bacilos lácticos vivos	10 millones células
Lacteol	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10000.0 millones UFC
Lactobac	<i>Bacillus coagulans</i>	1000 millones de UFC

En Colombia se comercializan varios productos que sirven para restaurar la microbiota intestinal (tabla 1). Sin embargo, estos productos son adaptaciones de productos desarrollados en otros países y siguiendo la misma línea tradicional de productos en el mercado, es decir cambian las concentraciones y las combinaciones de bacterias probióticos, pero no hay una diferenciación o innovación en el tipo de microorganismo utilizado (Antonio, Rubio, Huertas, G, & Medina, 2014).

La superintendencia de industria y comercio realizó un boletín tecnológico en el 2014 en dónde hicieron una revisión de las patentes y marcas relacionadas con probióticos. En dicho

informe encontraron que países como China, con 1875 invenciones y 2040 patentes, y Estados Unidos con 975 y 5399 solicitud de patentes, son líderes mientras que, en Latinoamérica Brasil alcanzó el número más alto con 32 invenciones y 48 solicitudes, por el contrario, Colombia, solo tenía 3 invenciones y 3 solicitudes (Antonio et al., 2014).

5.5 Tecnologías Para Análisis De Poblaciones Microbianas

5.5.1 PCR

Este método fue desarrollado por Kary Mullis en 1983. Consiste en la amplificación de segmentos de ADN por medio de ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento específicos, asociados a eventos de desnaturalización, alineamiento y extensión de las moléculas de ADN. Requiere del diseño de iniciadores, que son secuencias específicas que permiten guiar y servir de plantilla a la acción de la polimerasa termoestable que se encarga de realizar la adición de los nucleótidos. Durante este proceso, la plantilla ya sintetizada, sirve a su vez de guía para el siguiente ciclo de amplificación, lo que resulta en teoría de un proceso de expansión exponencial, en donde, luego del número de ciclos se obtienen miles de copias del segmento de ADN original.

La PCR se ha vuelto una técnica preferida en el campo de las ciencias forenses debido a que se pueden amplificar cantidades muy pequeñas de ADN. Hoy en día se utiliza como método de rutina, en conjunto con la secuenciación, en los estudios de diversidad microbiana, debido a las dificultades que presentan muchos organismos no cultivables.

5.5.1.1 PCR En Tiempo Real (q-PCR)

La PCR en tiempo real (q-PCR) es un método cuantitativo, en donde se hace seguimiento ciclo por ciclo de la reacción de amplificación del ADN objetivo. La reacción está basada en la actividad 5'nucleasa de la *taq* ADN polimerasa y por medio del uso de moléculas reporteras con capacidad de emitir fluorescencia en cada ciclo de amplificación, se puede cuantificar en tiempo real la cantidad del producto amplificado. En esta técnica si se tiene en cuenta el número de ciclos y la cantidad de producto final amplificado se puede calcular la cantidad inicial del material genético si se compara con un patrón conocido. Entre las moléculas fluorescentes utilizadas se encuentran los colorantes que se unen al ADN de doble cadena, moléculas unidas a los iniciadores o sondas que hibridan con los productos de la amplificación (Khan, Khan, & Barh, 2016).

El cambio en la fluorescencia durante el curso de la reacción es medida por el instrumento que combina los ciclos térmicos con su capacidad de detectar la intensidad de la fluorescencia. Esta señal, puede extraerse en forma de información y compararse con el número de ciclo y así obtener una gráfica que representa el producto acumulado obtenido durante la duración de la reacción.

La q-PCR consta de 3 pasos fundamentales, cada uno de los cuales constituye uno de los ciclos de la reacción de amplificación, una reacción típica consta de 40 ciclos. Los pasos son.

- Desnaturalización: se realiza una incubación a alta temperatura con el objetivo de disociar las hebras dobles de ADN en hebras sencillas, este paso generalmente se hace a 95°C.

- Alineamiento: en este paso la temperatura baja permitiendo que las hebras complementarias se hibriden. La temperatura usada en este paso depende de la temperatura de disociación de los iniciadores.
- Extensión: entre 70-72°C, la actividad de la polimerasa es óptima, y la extensión de los iniciadores ocurre a una tasa de 100 bases por segundo.

5.5.2 Nuevas Técnicas De Secuenciación

Ha sido gracias a avances tecnológicos como el desarrollo de análisis filogenéticos cimentados en el ARN ribosomal 16S y la mejora de los análisis computacionales que hemos podido observar y estudiar estas comunidades microbianas (Chen, Zhang, Cheng, Zhang, & Zhao, 2013).

El proceso de secuenciación se encarga de descifrar el ordenamiento de los nucleótidos que conforman una molécula de ADN dada. Esta técnica desarrollada en 1970 por Fred Sanger y conocida como método Sanger. Éste método se considera de “primera generación”. La innovación tecnológica ha avanzado en busca de métodos más rápidos y que provean un producto de secuencias más abundante, estas nuevas tecnologías se consideran de “segunda”, “tercera” y “cuarta” generación, en la actualidad se le denomina secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés). Actualmente, hay diferentes técnicas de secuenciación que serán especificadas a continuación (Khan et al., 2016).

5.5.2.1 Secuencia De Terminación Reversible (Illumina)

En esta técnica, los conjuntos de secuencias diana se amplifican en una superficie sólida (amplificación de puente). En la reacción de secuencia, se utilizan cuatro tipos de

nucleótidos, cada uno marcado como uno de los cuatro fluóforos incluyendo una terminación reversible de 3'. Con esta técnica, menos de 1 µg de ADN se necesita para hacerla, y genera lecturas de una longitud de 75 bp y más falsos positivos (Canard & Sarfati, 1994).

5.6 Análisis De Datos Metagenómicos

5.6.1 Diversidad Alfa

Provee una medida de la riqueza de especies de un área o muestra dada, independientemente de su tamaño muestral (Nemergut et al., 2013). Dos aspectos de la diversidad alfa son tenidos en cuenta: uno, es la diversidad en el sentido estricto de la riqueza de especies y el otro es la medición de las pendientes, las cuales expresan la tendencia de la secuencia. El índice Simpson expresa la dominancia o la concentración relativa de los valores de importancia en las primeras o primeras pocas especies. Mientras que, el índice de Shannon-Wiener expresa la equidad relativa o la equivalencia en los valores de importancia a través de las secuencias encontradas. Dentro del estudio de la riqueza se encuentran los análisis de rarefacción. Otros métodos están basados en modelos paramétricos, no paramétricos e índices de abundancia proporcional (Simpson) o índices de equidad (Shannon)

5.6.1.1 Curva de rarefacción

La curva de rarefacción es una comparación estandarizada de la riqueza de especies en función del número de muestras tomadas. En donde la abundancia de la muestra más grande es rarificada hacia la abundancia total de la muestra más pequeña para determinar si la riqueza de especies cambia (Gotelli & Colwell, 2001)

$$\tilde{S}_{ind}(m) = S_{obs} - \sum_{X_i > 0} \left[\binom{n - X_i}{m} / \binom{n}{m} \right], m < n$$

En dónde:

S_{ind} representa el número esperado de especies en una muestra al azar de un número m de individuos en una muestra de referencia de n individuos. S es el número de especies y X_i las abundancias de especies observadas.

Si la curva alcanza la asíntota, se asume que la riqueza máxima ha sido alcanzada para dicha muestra. Si, en cambio, la curva no llega a nivelarse, se considera que el muestreo, o secuenciación, no ha tenido la profundidad suficiente (Kumar et al., 2014).

5.6.1.2 Índice de Chao1

El estimador de riqueza Chao1 usa el número de especies que aparecen una (singleton) o dos veces (doubleton) en una población diversa con el cual se obtiene el rango inferior de aparición de una especie determinada. (Gotelli & Chao, 2013).

$$\hat{f}_0 = \begin{cases} [(n - 1)/n]f_1^2 / (2f_2), & \text{if } f_2 > 0 \\ [(n - 1)/n]f_1(f_1 - 1) / 2, & \text{if } f_2 = 0 \end{cases}$$

En donde:

f_1 corresponde a los singletons y f_2 a los doubletons

El fundamento en este estimador de diversidad es que, mientras al examinar una población se continúan descubriendo especies raras (singletons), aún existe posibilidad de que se encuentren especies raras; pero, tan pronto como se empiecen a encontrar especies dos

veces (doubletons) en dos oportunidades, significa que no hay más especies nuevas encontradas.

5.6.1.3 Índice de Shannon

Tiene su fundamento en la teoría de la información, y representa la incertidumbre acerca de la identidad de un individuo desconocido. En un entorno altamente diverso, y distribuidos equitativamente, un individuo desconocido puede pertenecer a cualquier especie, llevando a una alta incertidumbre en las predicciones de su identidad. Mientras que, en un sistema poco diverso y dominado por pocas especies, es más fácil predecir la identidad de los individuos desconocidos y hay menos incertidumbre en el sistema (Morris et al., 2014)

5.6.2 Diversidad Beta

Se define como la variación en las identidades de especies entre sitios o muestras y proporciona una conexión. Siendo éste índice el más genuinamente relacionado con el corazón de la ecología de la comunidad de estudio.

Existen múltiples medidas para la medición de éste parámetro, y aún no hay un consenso acerca de cuál es la más apropiada para aproximarse a una problemática ecológica dada. Entre ellas, algunos utilizan las abundancias relativas de especies, la taxonomía, las distancias filogenéticas o las relaciones funcionales entre especies (Anderson et al., 2011).

Para calcular la diversidad beta, se utilizan índices de similitud/disimilitud, entre ellos Bray-Curtis, Sorensen y el de Jaccard, siendo el Bray-Curtis el más utilizado.

Bray-Curtis determina la diferencia de las comunidades, en base a la función matemática de Manhattan-métrica, y utiliza el intervalo de 0= similitud y 1= diferencia.

5.6.2.1 SPLSDA

El objetivo principal de esta metodología es imponer la dispersión en el contexto de mínimos cuadrados parciales y, de este modo, llevar a cabo la reducción de dimensión y la selección de variables simultáneamente (Cao, Lê Cao, Boitard, & Besse, 2011). Se diferencia de análisis discriminante lineal (LDA, por sus siglas en inglés) en que puede usarse cuando el número de variables predictores (OTUs, en este caso) es mayor en relación al número de observaciones (Cao et al., 2011).

5.6.2.2 SPIEC-EASI (*SParse Inverse Covariance Estimation for Ecological Association Inference*)

Este es un método para la inferencia de redes ecológicas microbianas a partir de un conjunto de datos de amplicones producto de secuenciación. SPIES-EASI combina una transformación de datos diseñada para el análisis de datos composicionales bajo un marco de referencia que asume que la red de asociación ecológica subyacentes es dispersa. Para esto , utiliza algoritmos que calculan la dispersión de vecindad y la selección de covarianza inversa (Kurtz et al., 2015).

5.6.2.3 METAGENOMESEQ

Los estudios metagenómicos en la actualidad se enfocan en entender las diferencias en las comunidades microbianas ocasionadas por diferencias fenotípicas. El análisis de datos de secuenciación de alto rendimiento es un reto para los investigadores debido a muchos sesgos biológicos y tecnológicos que se presentan al muestrear marcadores genéticos.

MetagenomeSeq implementa una nueva técnica de normalización y un método que asume dispersión en los datos. A diferencia de otros métodos como Metastats y LEfSe, los cuales consisten en una prueba de permutación no paramétrica en t-statistics y la segunda es una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de subsiguientes pruebas de suma de rangos de Wilcoxon en subgrupos, pero ninguna de las dos apunta a normalización ni dispersión de los datos (Paulson, Stine, Bravo, & Pop, 2013).

La normalización permite controlar los sesgos en la medición entre las categorías taxonómicas. El software permite establecer OTU's característicos que permitan diferenciar aquellas OTUs cuyas abundancias sean distintas entre los grupos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 *Obtención de la muestra*

Se obtuvieron muestras de suero y heces de 30 pacientes infectados y 30 controles. Las muestras se encontraban en conservación en el laboratorio de Virología de la Universidad del Norte en donde se hallaban congeladas a -150°C.

Según se reportó en todos los casos, se les proporcionó a los participantes un consentimiento informado para la participación en el estudio, el cual fue revisado y aprobado por el comité de ética de la Universidad del Norte. La historia clínica de cada uno de los pacientes fue objeto de escrutinio y se realizó la confirmación de infección por Western Blot. También se tuvo en cuenta que ninguno estuviera en tratamiento con antirretrovirales, o que padecieran de alguna infección o enfermedad tales como hepatitis B, C, diarrea y que ninguno hubiese ingerido antibióticos en los últimos 30 días previos a la toma de muestra.

6.2 *Secuenciación del gen rARN 16S*

Para el análisis de la región variable V3-V4 del gen ribosomal 16S a partir de muestras de materia fecal se tomaron 60 muestras de heces congeladas a 150 °C en el laboratorio de Virología de la Universidad del Norte, correspondientes a 30 pacientes infectados y 30 controles sanos, y se empacaron de acuerdo a las normativas requeridas para transporte de material biológico, para luego ser transportadas al Centro Nacional de Secuenciación Genómica, localizado en el edificio SIU de la Universidad de Antioquia. El secuenciamiento se logró usando la plataforma MiSeq usando lecturas apareadas de 300 bases cada uno, obteniendo 11.1

millones de pares de lecturas clasificadas en OTUs. Para realizar los análisis se seleccionaron 20.000 lecturas al azar por muestra, produciendo 726 OTUs. El análisis de calidad, generación de OTUs y la clasificación taxonómica se realizó utilizando la plataforma MOTHUR en su versión 1.38.1.

6.3 Análisis bioinformático de diversidad microbiana

Dada la naturaleza composicional de los datos provenientes de la secuenciación, se restringe el análisis a un espacio matemático llamado simplex, en el cual se condiciona la presencia de valores no negativos (Smith, Renner, & Haslett, 2016; Weiss et al., 2017). Esta característica es impuesta por la misma tecnología utilizada que establece un límite máximo de lecturas. Otra consideración a tener en cuenta es la naturaleza multivariable de los estudios metagenómicos, la cual exige el uso de modelos dispersos y análisis no paramétricos para interpretar y visualizar este tipo de datos.

Por lo tanto, se aplicó “centered log ratio transformation” (CLR) de Aitchison para poder llevar los datos a un espacio euclidiano. De esta forma, es posible comparar de forma apropiada cada OTU entre las distintas muestras. La función usada para la transformación CLR fue *logratio.transfo* presente en el paquete *mixOmics*. Se realizó una estrategia de reemplazo bayesiano multiplicativa con la función *cmultRepl* del paquete *zCompositions* que nos permite reemplazar los ceros en las tablas de conteos.

El paquete SPIEC-EASI (Kurtz et al., 2015) se empleó usando la estrategia de Meinshausen-Buhlmann para la estimación gráfica de la red de correlación. Para reducir la cantidad de falsos positivos durante la creación de las redes, se eliminaron las OTU's que no estuvieran presentes en al menos el 50% de las muestras. Para verificar cuáles bacterias o variables eran las más

importantes o diferenciadoras entre grupos, se utilizó el análisis discriminatorio disperso por PLS (Partial Least Squares) o sPLS-DA, en el que las bacterias más importantes fueron agrupadas en el primer componente. En todos los casos se usaron los datos normalizados por CLR. Para analizar las diferencias en las comunidades microbianas entre los distintos pacientes se utilizó MetagenomeSeq (Paulson et al., 2013). Los paquetes mencionados fueron aplicados en la plataforma R, RStudio Versión 1.0.136 y GNU Octave 4.2.1.

6.4 Amplificación de los fragmentos de los genes *buk* y *but* por PCR en tiempo real.

Para evidenciar la presencia de los genes involucrados en la producción de butirato en el intestino se escogieron dos genes, el gen de butirato kinasa (*buk*) asociado al *Clostridium acetobutylicum* (Vital et al., 2013), y el gen butiril-CoA: acetato CoA-transferasa (*but*) (Louis, Young, Holtrop, & Flint, 2010), asociada a *Roseburia hominis*. Estos genes fueron amplificados por medio de PCR en tiempo real, usando el kit SYBR Green PCR Master Mix y SYBR Green RT-PCR Reagents K. Para lograr una cuantificación estimada de las copias de los genes diana, se secuenciaron ambos genes y se realizaron las correspondientes curvas estándar. Los resultados se relacionaron con los datos obtenidos del análisis de la microbiota encontrada. El equipo utilizado fue un Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, 2010).

6.4.1 Iniciadores

Se diseñaron 2 distintas parejas de iniciadores degenerados (Louis & Flint, 2007) con el programa *Primer3* versión 0.4.0 de acceso libre (Rozen, 2000), los cuales consistieron en una pareja para la detección del gen de butirato kinasa (*buk*) y el otro para el gen de butiril-CoA: acetato CoA-transferasa (*but*) (Tabla 2).

Tabla 2 Primers utilizados para la cuantificación de los genes bacterianos *buk* y *but*.

Gen	Secuencia	Longitud del amplicón (bp)
<i>G_buk_F</i>	TGCTGTWGTGGWAGAGGYGGA	279
<i>G_buk_R</i>	GCAACIGCYTTTGTATTAAATGCATGG	
<i>BCoATscr_F</i>	GCIGAICATTTACITGGAAYWSITGGCAYATG	530
<i>BCoATscrR</i>	CCTGCCTTTGCAATRTCIACRAANGC	

Se tuvieron en cuenta algunos aspectos: longitud, % G/C, tamaño del producto de amplificación, formación de estructuras secundarias, T^om característico y promiscuidad de los mismos.

6.4.2 Condiciones de la-PCR en tiempo real (q-PCR)

Las PCR en tiempo real se realizaron con un volumen final de 20 µL conteniendo en cada caso: 10 µL SYBR Green PCR Master Mix y SYBR Green RT-PCR Reagents K. Para el caso de cada q-PCR se utilizó 1.6 µL de iniciador F/R y para el gen *but*, y 1.6 µL de iniciador F/R para el gen *buk*. Finalmente, se agregó, 5 µL de ADN sin diluir en cada pozo de reacción con cada una de las mezclas. El perfil térmico para cada q-PCR consistió en: 95.0°C/10min seguido de 40 ciclos de 95.0°C/15 seg., 60.0°C/1 min., 72.0°C/45 seg.

6.4.3 Preparación de la curva estándar

Para la optimización de la q-PCR se utilizó como estándar un plásmido secuenciado con una copia del gen *but* y otro de igual forma para el gen *buk* (tabla 2). Con ellos se prepararon las curvas estándar a partir de diluciones seriadas en base 10 de cada gen por duplicado (10^6 a 10^2). El número de copias se determinó calculando el peso molecular del plásmido y las diluciones

teniendo en cuenta que la longitud total del plásmido *but* era de 4093 pb y el correspondiente al *buk* era de 3860 pb, con lo que según se calculó teniendo en cuenta que 660 por casa base, 1 mol= 6×10^{23} moléculas (Notes, 2003). Al final del proceso se crearon las curvas de disociación para confirmar la amplificación específica del producto deseado.

6.5 Selección de candidatos para uso probiótico

Empleando la misma estrategia utilizada para encontrar bacterias características que sirvieran para diferenciar el grupo de infectados, se intentó, de igual forma, identificar OTUs diferenciadores dentro del grupo de individuos sanos con el objetivo de descubrir posibles predictores de la condición sana en el grupo control. Una vez identificados, se realizó una revisión bibliográfica para escoger aquellos candidatos que cumplieran, de acuerdo a distintas fuentes bibliográficas, con los requisitos mínimos para su uso como probióticos en el campo farmacéutico.

7 RESULTADOS

7.1 Análisis bioinformático de diversidad microbiana

7.1.1 Curvas de rarefacción

Se fabricaron las curvas de rarefacción de cada una de las muestras tomadas, localizando en el eje X el número de secuencias obtenidas y en el eje Y el número de especies observadas (Gotelli & Chao, 2013). Para la construcción de las curvas se tuvieron en cuenta aquellas OTUs que estuvieran en al menos el 50% de los individuos.

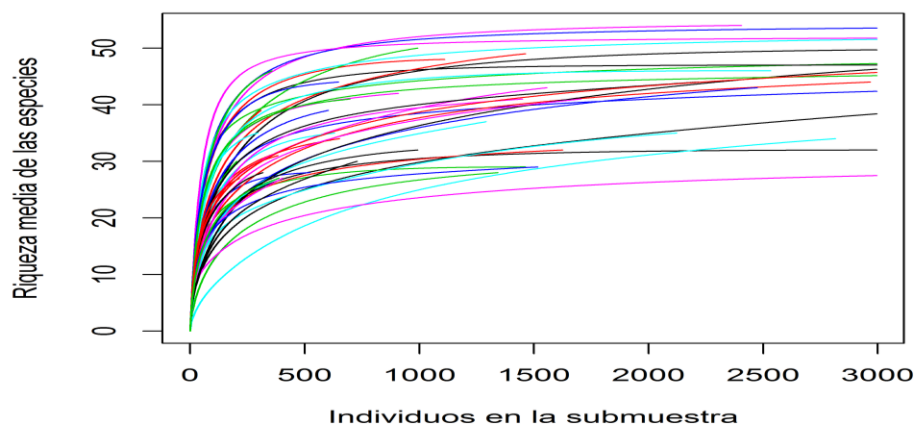


Figura 1 Las curvas de rarefacción de la diversidad alfa de todas las muestras se acercan a la asintota, indicando que la profundidad de muestreo fue suficiente para la descripción y el análisis apropiado de los microorganismos presentes en las muestras.

En cada muestra se alcanzó la asintota y se obtuvo una riqueza máxima de 51 OTUs. Esto evidencia una alta diversidad en las muestras y nos confirma que el muestreo alcanzado fue suficiente para mostrar todas las especies posibles presentes (figura 1).

7.1.2 Diversidad Alfa

Según los análisis de diversidad alfa, en donde se revisaron los índices de Chao y de Shannon (ver Figura 2), Chao1 no presentó diferencias significativas entre el grupo de individuos infectados con VIH en comparación con el grupo de individuos control.

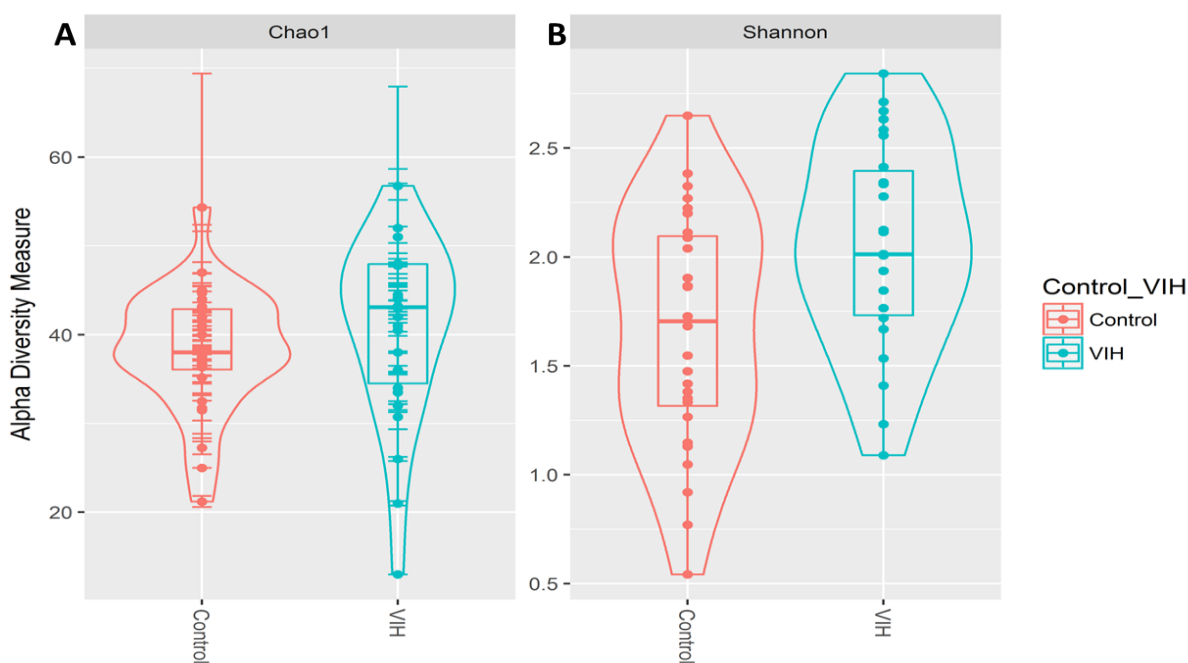


Figura 2 Índices de diversidad Alfa donde se aprecian los índices de riqueza entre las muestras del grupo control e individuos infectados con VIH en los que se observa un incremento en la riqueza a través del índice de Shannon y Chao1.

Al hacer la valoración del índice del Chao1, el índice máximo encontrado en los controles fue de 54.33 y en los individuos infectados fue de 56. Se encontraron índices mayores en el grupo de pacientes infectados lo cual indica una variación en la riqueza y en la diversidad de especies presentes (figura 2A).

Los índices de diversidad de Shannon, que se basan en la riqueza de los taxones más comunes, sí presentaron significancia ($p=0.014$), mostrando una mediana de 2, mientras que el grupo control tuvo una mediana de 1.75, indicando un aumento de la diversidad (Figura 2B). Al categorizar el grupo de individuos infectados con el virus según el grado de activación de sus CD4+, Chao1 no mostró diferencia significativa, pero sí mostró una tendencia decreciente en la riqueza a medida que el porcentaje de activación aumenta. Shannon sí expuso diferencias significativas ($p=0.015$) manifestando, por el contrario, un aumento de la diversidad correspondiente al porcentaje de activación con respecto al control. En el grupo (activación menor o igual al 5%) índice Chao1 fue de 56,7, el grupo 2 cuya activación corresponde al rango entre 5% y el 10%, tuvo un índice de 52, mientras que el grupo 1 con una activación mayor al 10% presentó un índice de 48 (figura 3).

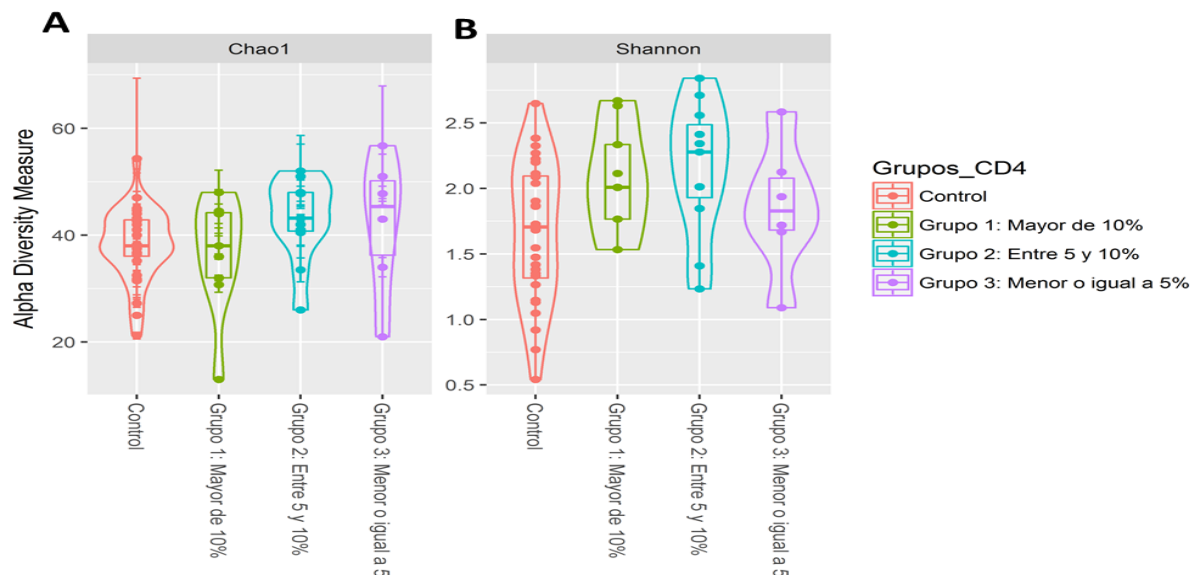


Figura 3 Índices de diversidad Alfa donde se aprecian los índices de riqueza entre las muestras del grupo control e individuos infectados con VIH, discriminados según el grado de activación en los que se observa un cambio en la riqueza correspondiente a través del índice de Shannon y Chao1.

7.1.3 Diversidad Beta

Al realizar el agrupamiento y cálculo de las matrices de distancia de Bray-Curtis, no se encontró una diferenciación clara entre las poblaciones control e infectados. Sin embargo, el

primer subgrupo de VIH con mayor grado de activación se distribuyó de forma opuesta dentro del primer componente al segundo grupo y de acuerdo al grado de inflamación ($p=0.002$). El segundo grupo se distribuyó en forma de gradiente, pero de forma significativa, en medio del subgrupo 1 ($p=0.045$) y 3 ($p=0.035$). Se calculó la beta diversidad utilizando matrices de distancia sin pesos con UNIFRAC junto con el método de análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés)(Kuczynski et al., 2011) (figura 4).

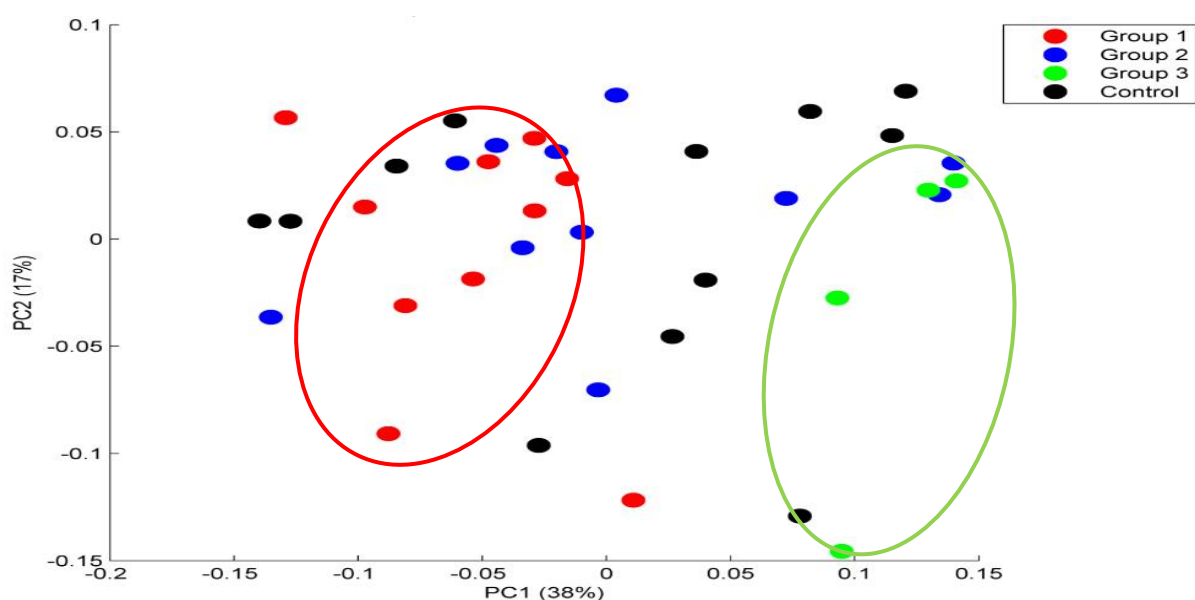


Figura 4 Análisis de componentes principales de la diversidad beta usando la métrica UNIFRAC ponderada. Los subgrupos de los individuos infectados por HIV tienden a separarse en PC1, en donde el subgrupo HIV-1 se encuentra en el sentido opuesto más distante con respecto al subgrupo HIV-3. Así mismo, el subgrupo HIV-1 tiende a separarse del grupo control.

7.1.4 Estructura de la comunidad microbiana

Para establecer los cambios en las abundancias de los grupos taxonómicos se realizaron gráficos de barras de abundancias relativas. En los controles se encontró que a nivel de filo Bacterioidetes, Firmicutes y Proteobacteria presentaron una mayor abundancia, siendo los más dominantes los dos primeros (70% y 80% respectivamente), mientras que, en el grupo de individuos infectados con VIH, Firmicutes fue el más abundante, seguido por Bacterioidetes y

Proteobacteria (figura 5A).

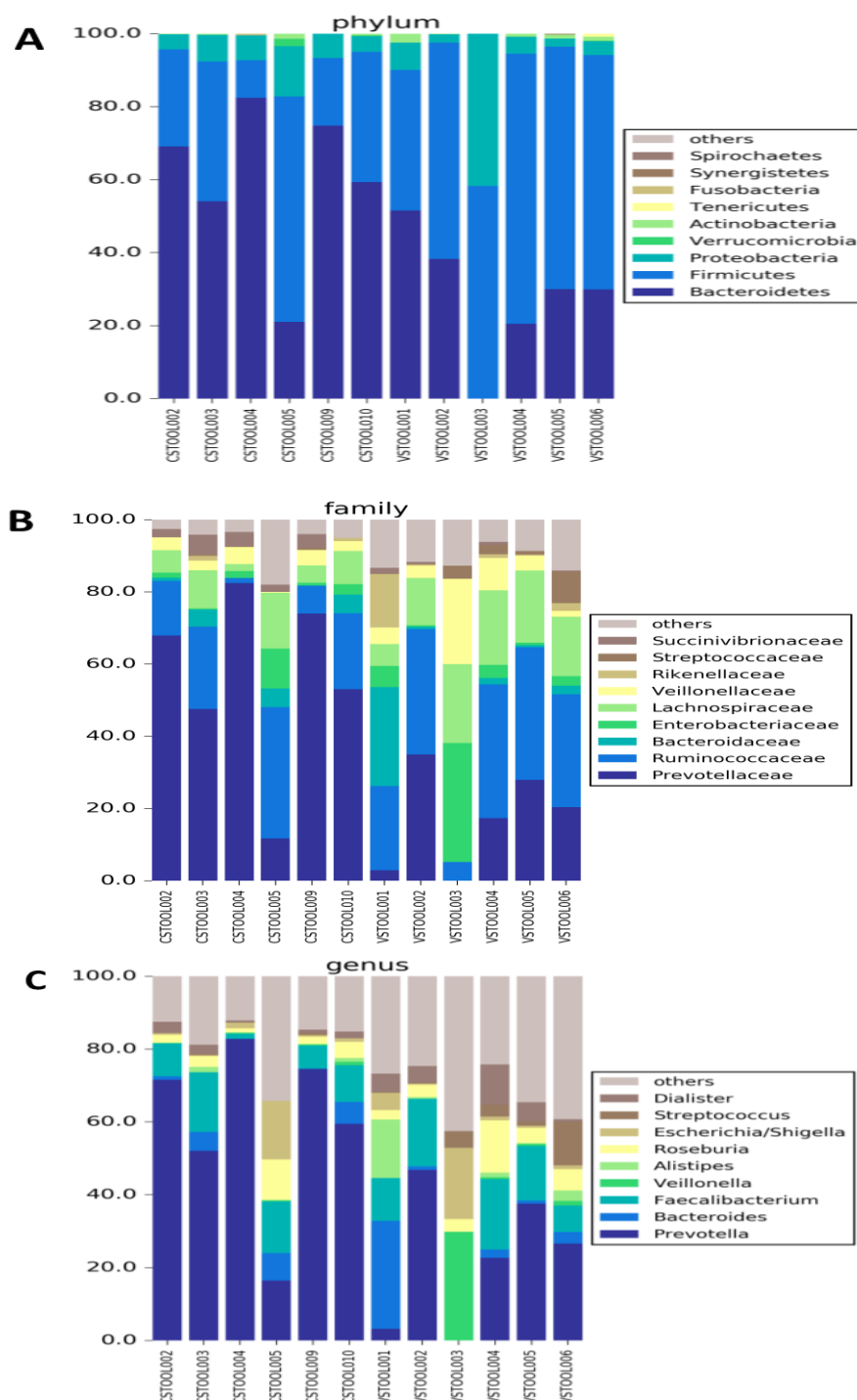


Figura 5 Abundancias relativas de los taxones de Bacterias más abundantes en 6 muestras escogidas al azar entre los dos grupos de muestras, controles sanos e individuos infectados con VIH, a nivel de filos A, familia B y género C.

Por otro lado, a nivel de familia, las Prevotellaceae tuvieron la mayor abundancia en el grupo de controles (>50%), seguidas por las Ruminococcaceae en menor proporción (10% - 20%); mientras que, en el grupo de pacientes infectados, se dio un cambio notable en la proporción de Prevotellaceae, disminuyendo (>10% - 20%) y las Ruminococcaceae aumentando su presencia en los infectados (30% -40%). La familia Lachnospiraceae presentó un incremento considerable en los pacientes infectados (>20%) (Figura 5B).

A nivel de género, *Prevotella* exhibió una abundancia dominante en el grupo de controles (mayor del 60% en casi todos los casos), seguida de *Faecalibacterium* (entre 10% y 20%), mientras que *Bacteriodes* estaban en niveles muy bajos (menos del 20%). En el grupo de pacientes infectados *Prevotella* presentó niveles muchos más bajos, pero manteniendo la mayor proporción (entre el 20% y 40%), *Faecalibacterium* lo siguió aumentando sus proporciones (entre un 20% y 30%) (Figura 5C).

7.1.5 Patrones de correlación y arquitectura de redes

Se comparó la estructura de las matrices de correlación y se crearon matrices de precisión de la microbiota a partir de las tablas de conteos de microbiota de los individuos infectados por VIH y el grupo de controles.

Antes de aplicar los análisis a los datos, se decidió seleccionar y restringir el análisis a los recuentos en donde las bacterias presentes estuvieran en al menos el 50% de las muestras para así evitar correlaciones espurias. Luego de esto, se hizo la normalización aplicando “centered log-ratio” de Aitchison, para poder manejarlos bajo una estructura Euclidiana y tener la libertad de aplicar métodos estadísticos tradicionales.

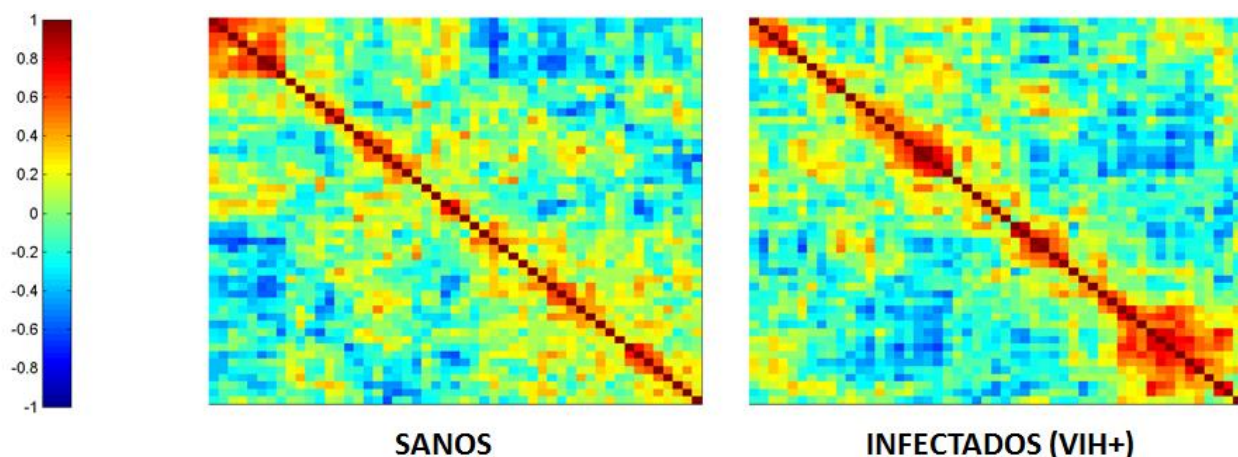


Figura 6 Individuos infectados por HIV muestran un patrón diferencial en la abundancia de correlaciones positivas y negativas con respecto a los individuos del grupo control.

Una vez normalizados los datos se procedió a calcular matrices de correlación de Pearson para cada grupo de muestras; es decir, una matriz para los individuos controles y una para los pacientes infectados con VIH. Estas matrices de correlación fueron visualizadas en mapas de calor (*heatmaps* en inglés), los cuales se ilustran en la Figura 6. Además, para cada una de las matrices se calculó la proporción observada entre los valores de correlación positivos y negativos. Se encontró un 47,48% de correlaciones positivas para el grupo de controles y un 44,94% para el grupo de infectados. En la Figura 6 se puede apreciar una diferencia cualitativa entre los *heatmaps* correspondientes a las matrices de correlación. Sin embargo, se debe llevar a cabo una prueba estadística que demuestre que existe en efecto una diferencia significativa. Se utilizó la prueba para el análisis diferencial de matrices de correlación de Jennrich, la cual lleva a cabo pruebas de hipótesis punto a punto basadas en el estadístico χ^2 para evaluar la igualdad de dos matrices de correlación (Jennrich, 1970). El análisis con esta prueba arrojó un valor p de 0, demostrando estadísticamente que la estructura de correlación de ambos grupos es diferente.

Durante la construcción de los mapas de calor, se encontró una amplia distribución de correlaciones positivas con algunos cúmulos de correlaciones positivas fuertes en el grupo de individuos no infectados. En la visualización de la matriz de correlación del grupo de pacientes infectados con VIH se vislumbró una estructura muy distinta, ilustrando una mayor cantidad de correlaciones negativas en comparación a los controles no infectados.

7.1.6 Redes de correlación por método SPIEC-EASI-MB

Aun cuando se observaron diferencias notables en las matrices de correlación estas incluyen correlaciones directas e indirectas, es por eso que, para poder diferenciar y dirigir el análisis a correlaciones directas exclusivamente, se usó el método de SPIEC-EASI-MB (Kurtz et al., 2015), el cual calcula unos coeficientes β a partir de la media del vecino más cercano y la selección de covarianza inversa. Todo esto asumiendo que los datos alimentados son dispersos, característica típica de este grupo de datos. Creando una red de datos dispersos que muestra relaciones más estables y directas entre nodos (OTUs) (figura 7).

Al comparar las redes creadas, se observó que la red grupo control tenía una red con una mayor riqueza de acuerdo a las correlaciones directas, lo que nos permite inferir que las correlaciones indirectas contribuyen a inflar la riqueza encontrada en las matrices de correlación en el grupo de VIH.

[illegible]

Se lograron distinguir diferencias entre las redes y en la forma en que ciertos grupos bacterianos se relacionan. En el grupo de controles se observaron varios integrantes del género *Prevotella* (OTU 13, OTU 12, OTU 7) que conformaban un gran nodo de relaciones mutualistas

el cual se redujo en el grupo de pacientes infectados por VIH, en donde crearon nuevas conexiones con el género *Blautia* (OTU 19). Este género formaba un nodo en el grupo de controles, compartiendo una correlación negativa con *Dorea* (OTU 32) y una positiva con *Gemmiger* (OTU 32) que hace parte de las Ruminococcaceae. Curiosamente en el grupo de VIH este pequeño nodo desaparece y es integrado al nodo de *Prevotella* (OTU 9) en donde la relación negativa que existía entre (OTU 9) y (OTU 21) cambia a ser positiva.

Se logró identificar un nodo dentro del subgrupo formado por el cúmulo de *Prevotella* (OTU 12) en la red dentro del conjunto de controles. Este nodo aparece separado en el grupo de infectados, formando un nodo independiente donde se presenta una fuerte relación mutualista entre *Parabacteroides* (OTU 6) y *Alistipes* (OTU 14).

La familia Ruminococcaceae (OTU 29) formó un nodo con otros integrantes de la misma familia (OTU 41 y OTU 40), sin embargo, este nodo no desapareció del todo en el grupo de infectados, ya que se mantuvo la relación entre miembros de la misma familia, pero cambiaron los OTUS involucrados desapareciendo el OTU 29 y apareciendo Ruminococcaceae (OTU 41) como nodo central. En el grupo de controles dos miembros de Bacteroidetes (OTU 3 y OTU 15) formaron un nodo de fuerte relación mutualista el cual desapareció al remitirnos al grupo de pacientes VIH+.

En términos generales, el grupo control tuvo una arquitectura de red enriquecida con *Prevotella*, mientras que el grupo de infectados presentó un cambio caracterizado por un aumento de la presencia de *Oscillibacter* (OTU 34, OTU 35), *Faecalibacterium* (OTU 30) y en mucho mayor medida integrantes de la familia de las Lachnospiraceae.

7.1.7 Evaluación por sPLS-DA de bacterias diferenciadoras

El análisis por sPLS-DA realiza una reducción de dimensiones de las variables a través de la selección de características con mejor desempeño, en este caso las variables o características evaluadas corresponden a los OTUs observados (Lee et al., 2014).

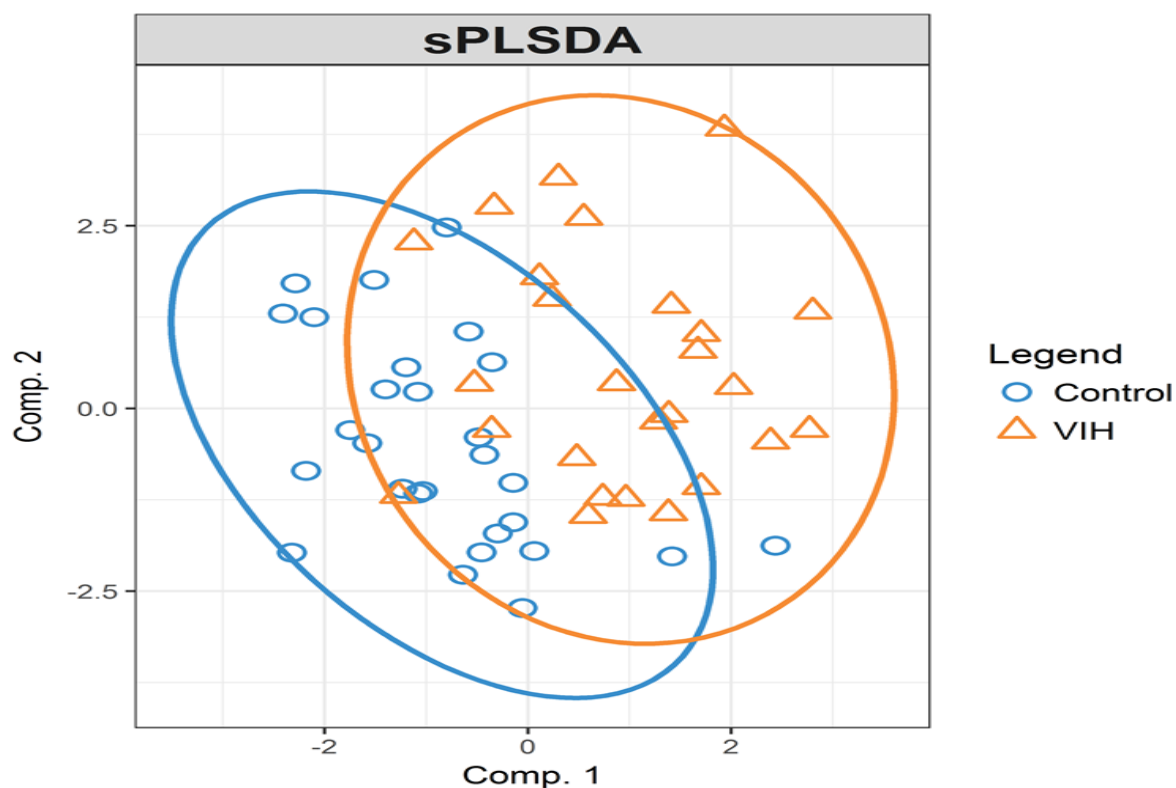


Figura 8 Identificación de los “OTUs signatures” asociados al grupo de individuos infectados por HIV. PCA graficando el modelo sPLS-DA alimentado con los OTUs transformados usando “centered log-ratio approach”.

Con este análisis no solo se logra observar la diferenciación entre los grupos, sino que, además, se pueden distinguir aquellas variables que marcan esa diferenciación de acuerdo a su importancia. Con esta selección y clasificación de variables es posible tratar de predecir el estado del paciente, la progresión de la enfermedad y poder tener un mejor criterio a la hora de tomar decisiones con respecto al tipo de intervención. En el presente estudio se escogieron las 10 bacterias que tuvieran mejor desempeño o, dicho de otra forma, aquellas que tuvieran mayor

fuerza o importancia para diferenciar los grupos analizados. Se realizó el análisis de acuerdo a sus componentes principales discriminantes mostrando una clara separación entre el grupo de controles y el grupo de pacientes infectados con VIH. Además de identificar la diferenciación de los grupos, también se buscó identificar los OTUs característicos que marcaran dicha diferenciación y que pudieran servir de posibles predictores.

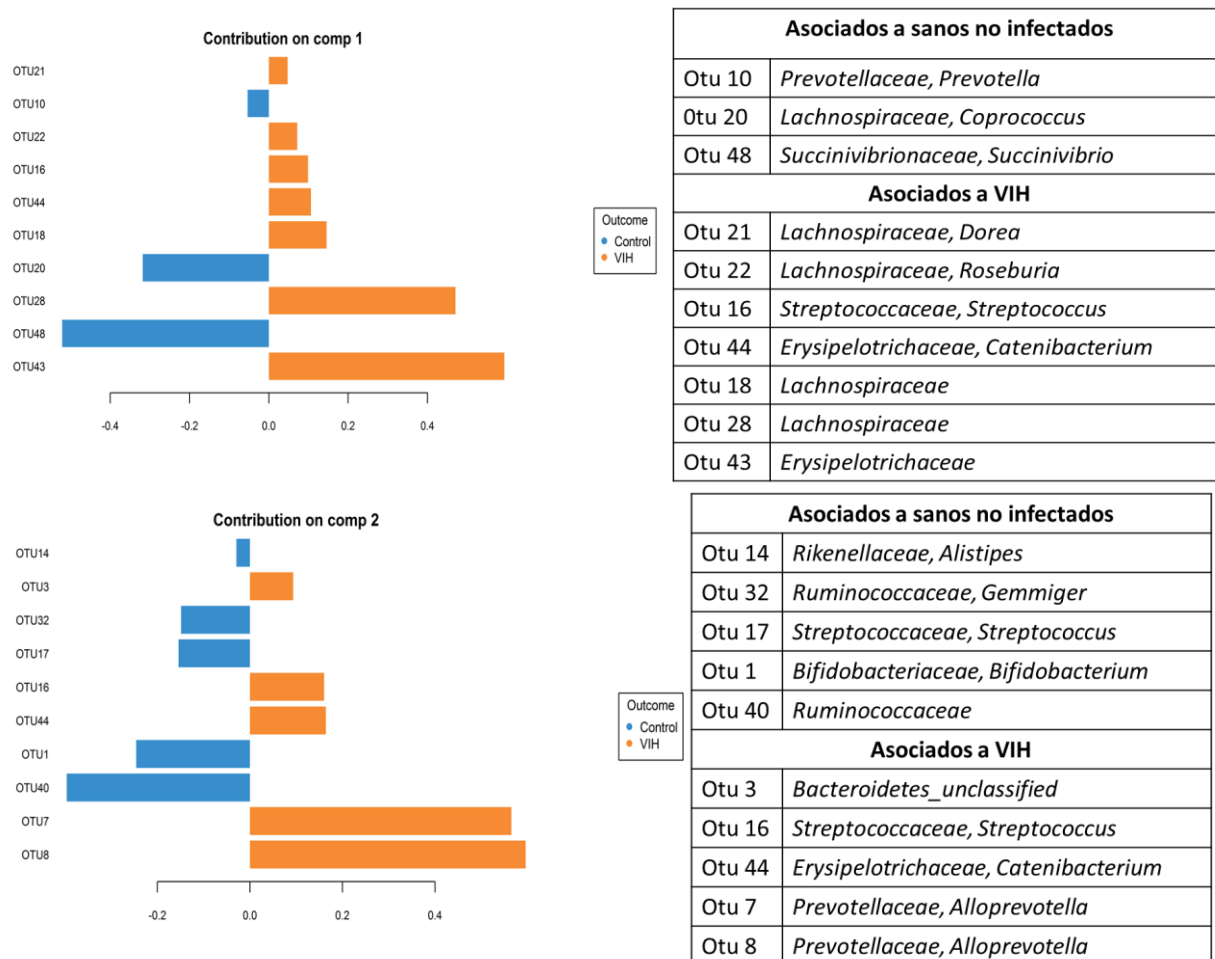


Figura 9 Identificación de los “OTUs signatures” asociados al grupo de individuos infectados por HIV. Gráfica de la contribución de los OTUs del componente 1.

Usando la técnica de análisis discriminante de cuadrados mínimos parciales (sPLS-DA, por sus siglas en inglés) el cual utiliza el algoritmo PLS para explicar y predecir la presencia de observaciones en distintas clases usando variables aclarativas, se pudo encontrar que el grupo correspondiente a los pacientes infectados con VIH tienden a separarse del grupo control (Figura

8). También logramos identificar las bacterias que sirven de marcador diferenciador más importantes en cada grupo. De acuerdo al primer componente, y en orden descendiente de importancia, las bacterias un género no identificado de Erysipelotrichaceae (OTU 43), dos géneros no identificados de Lachnospiraceae (OTU 28 y OTU 18), *Catenibacterium* (OTU 44), *Streptococcus* (OTU 16), *Roseburia* (OTU 16), *Dorea* (OTU 21) (Figura 9).

Los géneros encontrados, pertenecen a las familias Lachnospiraceae (OTU 28, OTU 18, *Roseburia*, *Dorea*), Erysipelotrichaceae (OTU 43, *Catenibacterium*), Streptococaceae (*Streptococcus*). De acuerdo a esto la mayoría de los géneros encontrados pertenecen al orden de los Clostridiales.

En el segundo componente encontramos los siguientes géneros diferenciadores. Dos integrantes de *Alloprevotella* (OTU 8 y OTU 7), seguida de *Catenibacterium* (OTU 44), *Streptococcus* (OTU 16), y un *Bacterioides* sin clasificar.

También se observaron cuáles OTUs diferenciadores hacían aparición cuando se organizaban los subgrupos de acuerdo al grado de activación CD4⁺ basado en la co-expresión de HLA-DR y CD38, y de esta manera saber si había alguna asociación con la severidad de la infección, ya que este fue el único valor que nos permitió distinguir entre el grupo de infectados y los controles sanos.

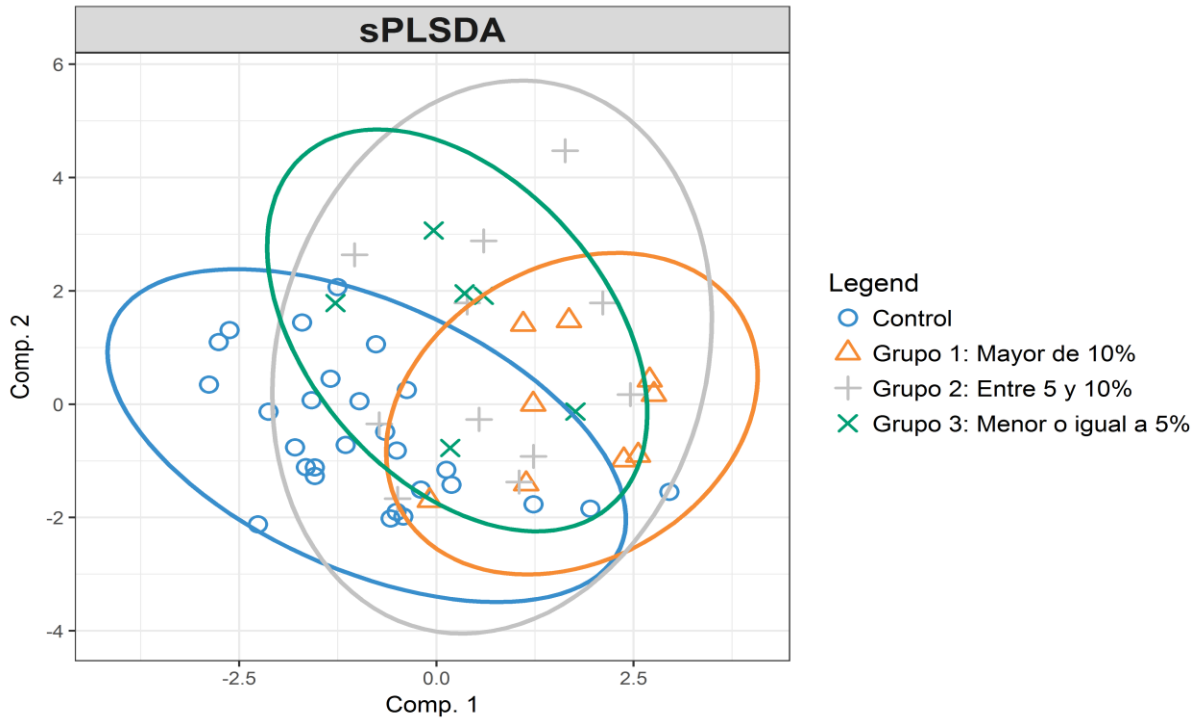


Figura 10 Grado de separación existente entre el grupo de sujetos sanos comparado con el grupo de infectados categorizados según el grado de activación de CD4+ explicado por el primer y segundo componente.

Se observó una separación notable en donde los subgrupos parecían distanciarse del grupo control de acuerdo al grado de activación. En donde el grupo 1 (activación mayor al 10%) se halló en el cuadrante más distante, mientras el grupo 3 (activación menor al 5%) se encontró más cercano al grupo de los no infectados (Figura 10).

Al observar la distribución de las bacterias que sirven como predictores o diferenciadoras, se observó que los OTUs correspondientes a *Streptococcus* (OTU 16), Lachnospiraceae (OTU 28) y Erysipelotrichaceae (OTU 43) fueron los marcadores con mayor fuerza en el sub grupo 1, mientras que *Roseburia* y *Alloprevotella* fueron los géneros característicos principales en el grupo 3, el de menor activación (Figura 11).

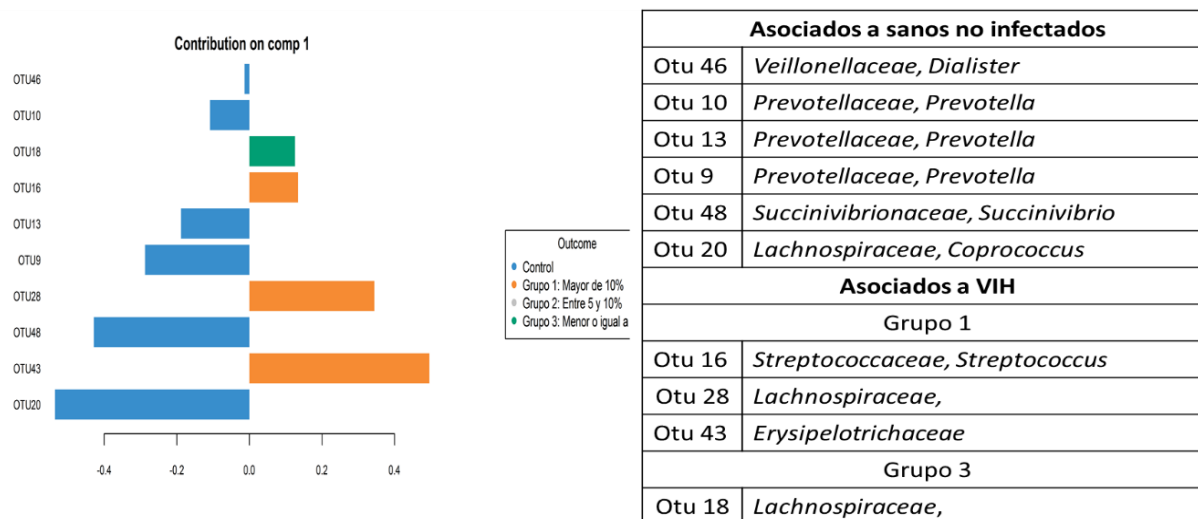


Figura 11 Identificación de los OTUs diferenciadores agrupados de acuerdo al grado de activación de CD4+ y explicados desde el primer componente.

7.1.8 Evaluación de los OTUs característicos por MetagenomeSeq.

Se empleó la herramienta MetagenomeSeq para evaluar si las bacterias identificadas anteriormente realmente pueden servir para discriminar entre los distintos sub grupos (Paulson et al., 2013). Esta herramienta, ha probado ser útil para este tipo de datos con naturaleza dispersa y composicional. Para considerar un OTU como marcador significativo se tuvo en cuenta su valor p y p ajustado (p_{ajd}) menor a 0.05.

Al comparar el grupo de los controles con el conjunto completo de individuos infectados con VIH, cuatro de las bacterias reportadas como diferenciadoras presentaron un valor p

ajustado (p_{ajd}) significativo ($p < 0.05$): *Roseburia* (OTU 22), $p_{ajd} = 0.002$, *Catenibacterium* (OTU 44), $p_{ajd} = 0.18$, Lachnospiraceae (18) $p_{ajd} = 0.03$, Erysipelotrichaceae (OTU 43) $p_{ajd} = 0.01$ y *Alloprevotella* (OTU7). Al confrontar el subgrupo 1 (nivel de activación mayor al 10%) y el grupo control Erysipelotrichaceae (OTU 43) tuvo una $p_{ajd} = 0.01$ (figura 12).

Los géneros *Catenibacterium* (OTU 44) $p = 0.04$, Lachnospiraceae (OTU 28) $p = 0.02$ no tuvieron una p_{ajd} significativa, sin embargo, su valor p estuvo por debajo de 0.05.

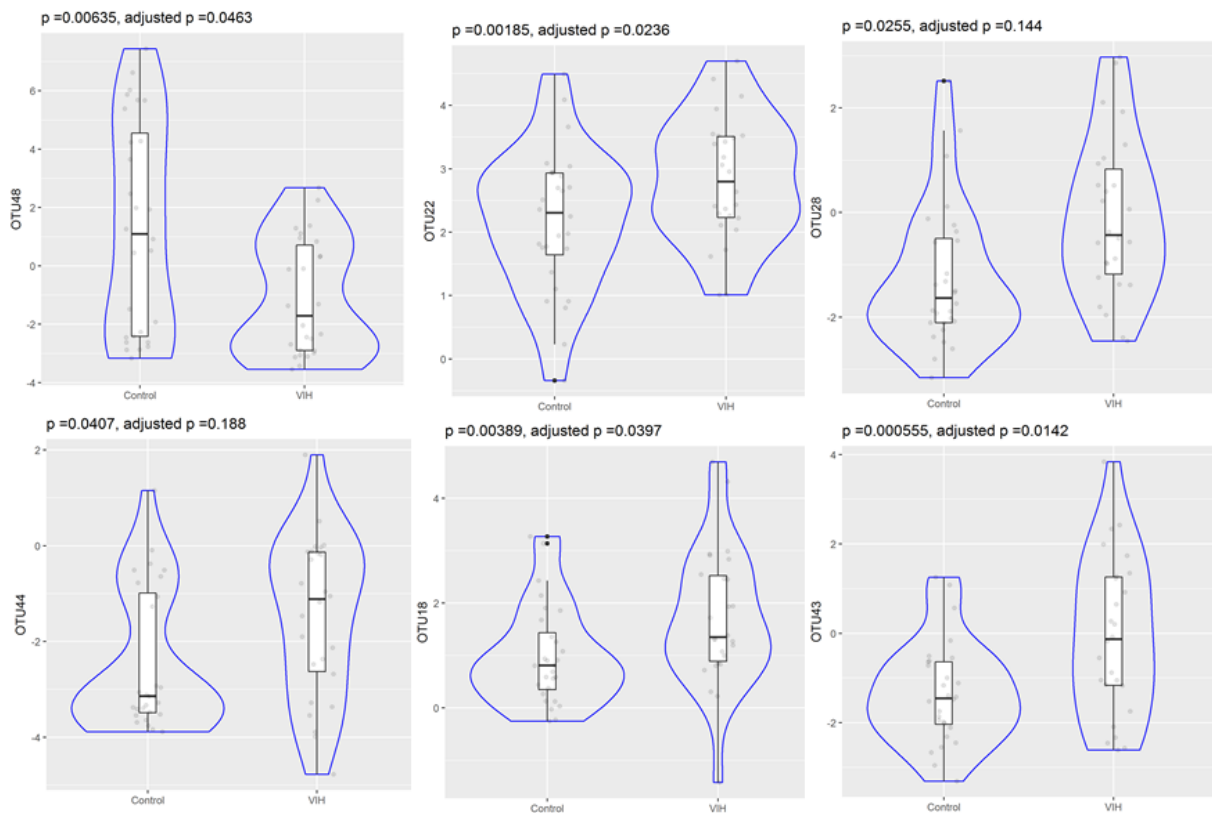


Figura 12 Gráfico de violín que muestra la distinción entre los controles y los pacientes infectados. Se escogieron los OTUs que fueron identificados como marcadores diferenciadores por sPLS-DA y que presentaron un p y p_{adj} significativa ($p < 0,05$). CONTROLES: OTU 48 *Succinivibrio*; INFECTADOS: OTU 22 *Roseburia*; OTU 44 *Catenibacterium*; OTU 18 Lachnospiraceae; OTU 28 Lachnospiraceae; OTU 43 Erysipelotrichaceae.

7.2 PCR en tiempo real (q-PCR)

Debido a que se lograron encontrar bacterias diferenciadoras representadas principalmente por integrantes de la familia de las Lachnospiraceae, cuyos integrantes se caracterizan por ser productores de ácidos grasos de cadena corta (Bergey, 2009; Cotta & Forster, 2006), y teniendo en cuenta que dichos organismos tendrían en común genes relacionados con la producción de ACG, se seleccionaron por medio de literatura dos genes, Butiril-CoA acetato-CoA-transferasa (*but*) y butirato kinasa (*buk*) (Cotta & Forster, 2006), para ver si era posible observar de igual forma diferencias funcionales en la microbiota.

7.2.1 Preparación de curva estándar

Para la cuantificación, cada dilución se preparó por duplicado y el umbral de fluorescencia que determina el Ct (Cycle Threshold, por sus siglas en inglés) fue señalado en 0.5 unidades de fluorescencia para de tal manera obtener una mejor regresión.

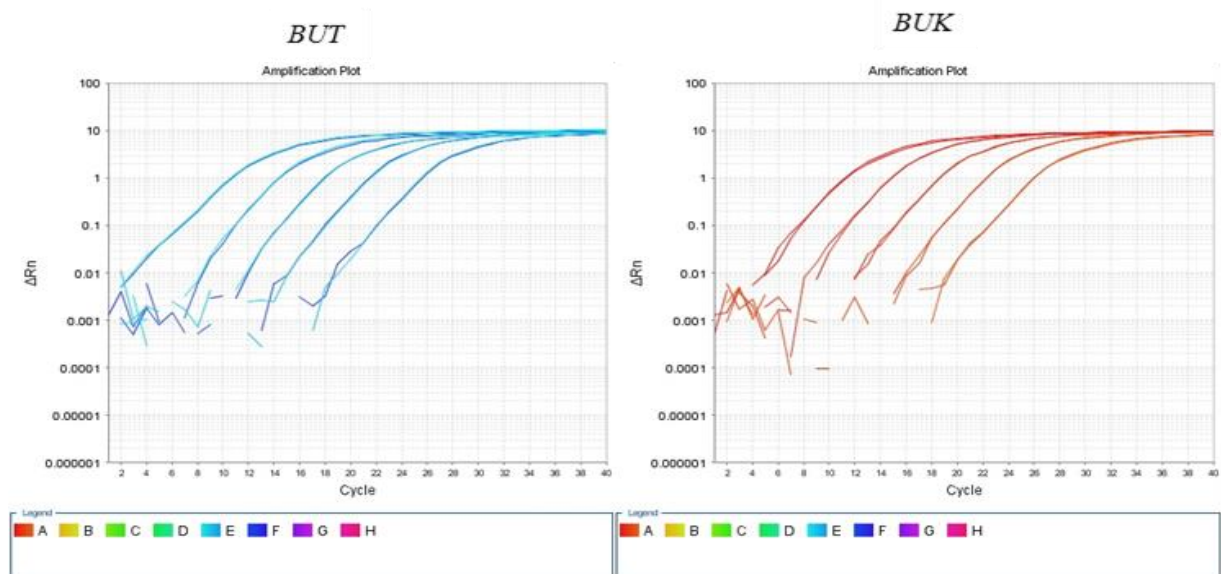


Figura 13 Amplificación de las diluciones de *but* y *buk* por PCR en tiempo real con SYBR Green. El rango lineal fue de 1.3×10^1 - 1.3×10^6 copias de *but*/μL de ADN (en azul). Para el gen *buk* el rango utilizado fue de 6.2×10^1 - 6.2×10^6 copias de *buk*/μL de ADN (en naranja).

Las diluciones seriadas del estándar fueron preparadas dentro de los rangos de concentración 1.3×10^1 - 1.3×10^6 copias por μL de ADN para *but* y 6.2×10^1 - 6.2×10^6 copias por μL de ADN para *buk*. de ADN para *buk* (figura 13).

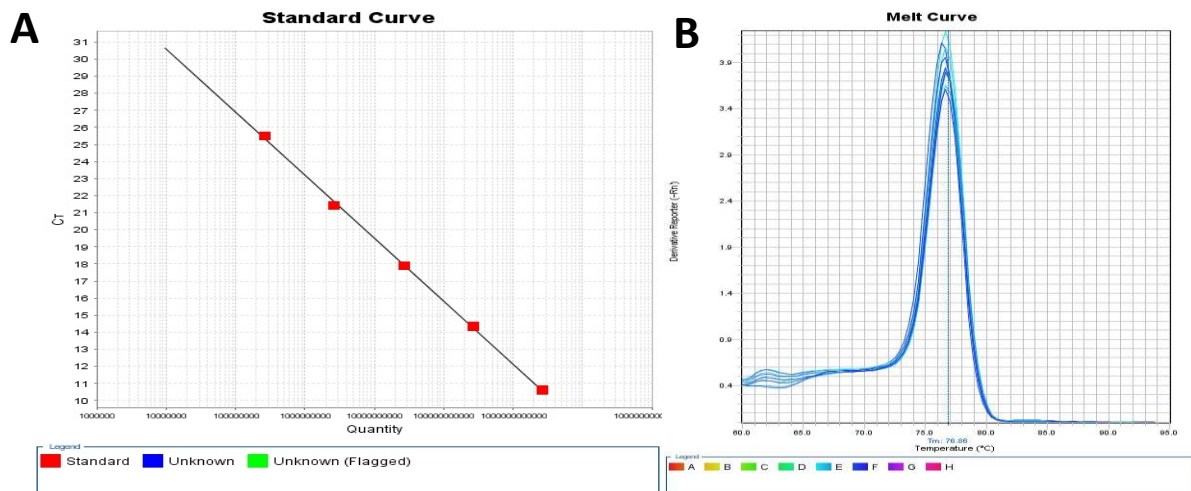


Figura 14 A) Regresión lineal de la curva estándar obtenida para el gen *but*. El gráfico representa los *Ct* obtenidos de los duplicados de cada punto de dilución de la curva estándar. B) curvas de disociación obtenidas de los productos de amplificación

Los coeficientes de regresión (R^2), la pendiente y la eficiencia obtenida de los puntos de dilución vs concentración de ADN para *but* fue de 0.999, -3.688, 86.12. Para *buk* 1, -3.715, 85.86 respectivamente (figura 14 A y 15A).

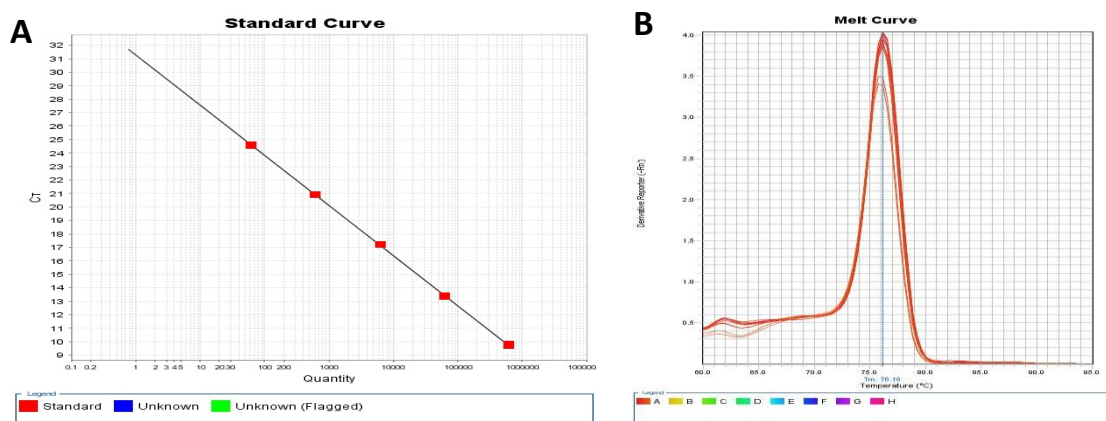


Figura 15 A) Regresión lineal de la curva estándar obtenida para el gen *buk*. El gráfico representa los *Ct* obtenidos de los duplicados de cada punto de dilución de la curva estándar. B) curvas de disociación obtenidas de los productos de amplificación.

La especificidad del proceso de amplificación de ambos genes fue tomada en cuenta por medio del análisis de la curva *melting*, que fue creada en la fase final de cada ronda de amplificación. Los productos de las diluciones tuvieron una temperatura de disociación de 76,86 °C para *but* y 76,18 °C para *buk* (figura 14B y 15B).

7.2.2 *Butiril-CoA acetato-CoA-transferasa y butirato kinasa presente en las muestras de heces por q-PCR*

Se utilizó el software GraphPad Prism 7.0 para Windows, realizando una prueba Mann-Whitney y t-Student para comprobación de hipótesis, y de esta forma precisar el análisis del número de copias de los genes de interés teniendo en cuenta una significancia determinada por $p < 0.05$.

Al observar el número de copias cuantificadas por q-PCR del gen butirato kinasa se encontró un valor medio de 155.580 copias por gramo de muestra en el grupo control y 130.976 en el grupo de infectados, sin embargo, no se lograron encontrar diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes infectados ($p=0.7$) (figura 16).

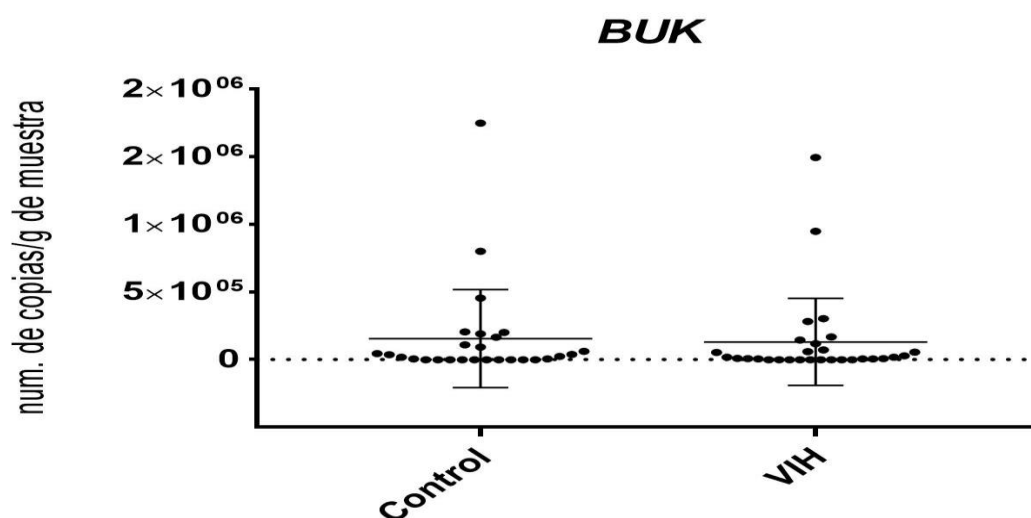


Figura 16 Comparación del número de copias del gen butirato kinasa (*buk*) presentes entre el grupo de individuos control y pacientes infectados con VIH como resultados del análisis por q-PCR.

Al llevar a cabo el análisis del número de copias del gen bacteriano butiril-CoA acetato-CoA transferasa (*but*) encontrado entre los grupos de sujetos sanos y pacientes infectados, tampoco se hallaron diferencias significativas ($p=0.8$) (figura 17), no obstante, este grupo presentó una media muy superior de 11'135.268 copias por gramo de muestra para el grupo de controles sanos, mientras, la media en el grupo de pacientes infectados fue de 12'279.771.

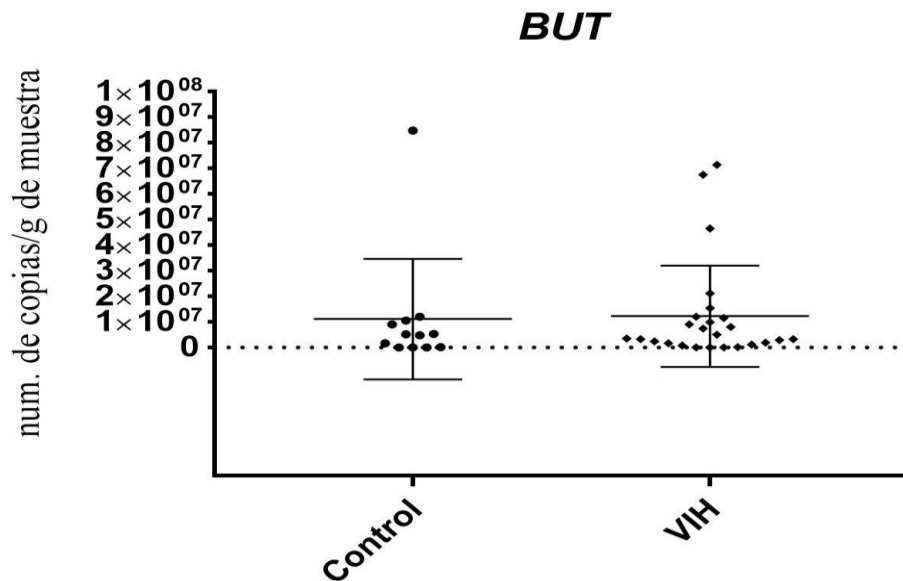


Figura 17 Análisis del número de copias del gen *but* encontrados entre el grupo de controles e infectados

A pesar de no lograr diferenciar los grupos por medio del recuento de copias de los genes analizado, al comparar las cuantificaciones totales de ambos genes, se observó un recuento total de copias del gen *but* considerablemente más abundante con respecto al encontrado en el gen *buk* (figura 18). De igual forma, se realizó el análisis estadístico de los datos y se encontró que esta diferencia si era significativa entre ambos genes ($p=0.0017$).

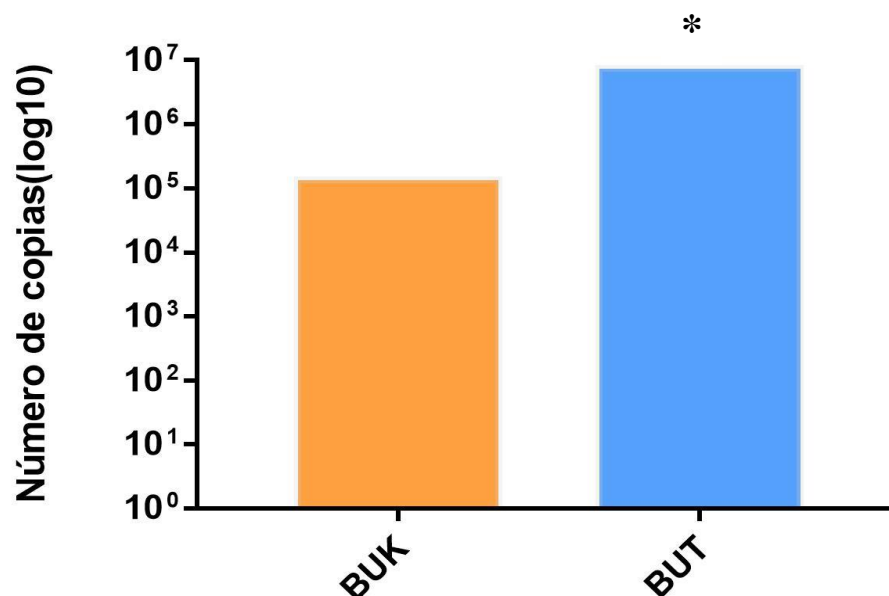


Figura 18 Recuento global del número de copias de ambos genes observado en el total de muestras estudiadas ($p < 0.05$).

7.3 Selección de candidatos para uso probiótico

Al analizar las bacterias presentadas en los controles como posibles predictores con sPLS-DA con MetagenomeSeq en busca de posibles predictores dentro del grupo de control, *Succinivibrio* (OTU 48) fue el único que presentó una p ajustada (p_{ajd}) significativa ($p_{ajd} = 0.04$).

De acuerdo a las recomendaciones hechas por múltiples autores (Deshpande, Rao, Keil, & Patole, 2011; Gismondo et al., 1999; Green et al., 1999; O'Toole et al., 2017; Ozyurt & Ötles, 2014; Preidis & Versalovic, 2009; Sanders, 2008), y las directrices presentadas por la WHO y la FAO en “Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food” y en “Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria” *Succinivibrio*, la bacteria seleccionada, cumple algunas de las características como: buena adherencia al epitelio intestinal, ya que este género es asociado normalmente a este entorno, tanto en humanos como en rumiantes (Sugawara & Nikaido, 2014), lo que le permitiría sobrevivir en el intestino y permitir que su posible efecto

terapéutico sea perdurable; produce ácido láctico y ácido butírico ambos con importante actividad probiótica, el primero ayuda a bajar el pH del medio restringiendo el crecimiento de patógenos (Midolo, Lambert, Hull, Luo, & Grayson, 1995) y el segundo amortigua la respuesta inflamatoria de las células epiteliales intestinales (Arpaia, 2014); no se considera un patógeno oportunista, y solo se han reportado 3 casos de bacteremia en donde la significancia clínica no ha sido concluyente (Johnson & Finegold, 1987; Porschen & Chan, 1977; Southern, 1975). Aunque es un anaerobio estricto, no es de difícil aislamiento y de fácil conservación en laboratorio (Garrity, Bell, & Lilburn, 2010). Desde el punto de vista metabólico, es fermentador de varios carbohidratos, entre ellos galactosa, fructosa dextrina, pectina, hemicelulosa y fermenta parcialmente el almidón (Sugawara & Nikaido, 2014), lo que hace que se comporte como un iniciador de la degradación de polisacáridos en el intestino, esto al parecer facilita este proceso en el rumen de los bovinos, por lo que puede asumirse un rol similar en el intestino de humanos (Garrity et al., 2010)

Es cierto que como parte de los requisitos para el diseño y consideración de un producto probiótico, es necesario hacer estudios más exhaustivos, pero el análisis aquí presentado presenta al *Succinivibrio* OTU 48 como un buen predictor para la identificación de sujetos sanos y de acuerdo a sus características morfológicas y metabólicas un buen candidato para realizar los análisis *in vitro* para así descubrir sus posibles bondades como probiótico intestinal nativo de individuos sanos mestizos colombianos.

8 DISCUSIÓN

Este trabajo de tipo observacional y transversal, buscó identificar diferencias en la estructura de las poblaciones bacterianas intestinales entre pacientes infectados con VIH e individuos sanos no infectados. Estudios de este tipo, si bien han sido materia de indagación en otras latitudes, no se han realizado de manera amplia en nuestro continente. Los resultados reportados aquí permiten inferir un delicado balance en las relaciones entre géneros y familias bacterianas que muestran susceptibilidad a perturbaciones una vez se presenta alguna condición que provoque cambios en la dinámica ambiental del intestino (Adair & Douglas, 2017).

En el análisis de Alfa diversidad de las muestras secuenciadas, el índice de diversidad Chao1 no mostró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de pacientes infectados, lo cual nos indica que el nivel de riqueza encontrado en las muestras analizadas no diferencia los grupos. Sin embargo, el índice de Shannon, que muestra la distribución entre los distintos microbios presentes, sí mostró diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes infectados ($p=0.014$); lo que indica un incremento en el número de especies reflejado en los índices encontrados en las muestras correspondientes a la colección de infectados, con respecto a grupo control. Lo que confirma un cambio en la diversidad microbiana relacionada con la infección. Quizá la disminución de los géneros dominantes (*Prevotella* y *Bacteroides*) en sanos da pie para el surgimiento de nuevas especies oportunistas. Por otro lado, al categorizar el grupo de infectados según el grado de activación de las células T CD4+, el índice de Shannon mostró diferencias significativas entre los subgrupos ($p=0.015$) y al analizar los índices obtenidos, se encontró una disminución de los mismos a medida que se incrementó el nivel de activación. Esto evidencia una pérdida del grado de diversidad o “evenness” entre los distintos grupos. Se observó que los individuos con mayor porcentaje de activación de células T

CD4⁺ tuvieron un menor número de especies observadas conteniendo una distribución más heterogénea. Por el contrario, el subgrupo que tuvo el menor porcentaje de activación de células T CD4⁺, presentó una riqueza mayor sostenida en una distribución más homogénea de las especies. Esto puede ser un indicador de la relación presente entre la dinámica de la microbiota y las perturbaciones del sistema inmune.

En las redes de correlación creadas usando la herramienta SPIEC-EASI MB para los pacientes infectados con VIH se observó presencia de *Faecalibacterium* y la disminución de las poblaciones de *Prevotella* (Nowak et al., 2015) con respecto a los controles. Asimismo, se presentó una disminución proporcional de acuerdo al grupo en el que se presentaban, muy distinto a lo que reportan Salas & Chang (2014) ya que ellos establecen que *Prevotella* se incrementa y *Bacteriodes* disminuye durante la infección. Sin embargo, aunque hubo disminución de *Prevotella*, en proporción mantuvo una abundancia mucho mayor que *Bacteroides*.

Prevotellaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae y Bacteroidaceae formaron nodos en el grupo control, mientras que en el grupo de individuos infectados, se presentó una pérdida significativa de sus vértices y una reestructuración de los nodos persistentes.

Al aplicar sPLS-DA y MetagenomeSeq a nuestra matriz de datos ya normalizados, lograron identificarse OTUs a nivel de género que discriminan los pacientes infectados con VIH y los controles. Los géneros identificados pertenecen a las familias Lachnospiraceae (OTU 28, OTU 18, *Roseburia*, *Dorea*, *Coprococcus*). Succinivibrionaceae (OTU 48) y Erysipelotrichaceae (OTU 43, *Catenibacterium*). Prevotellaceae (*Prevotella*).

Los altos índices de *Prevotella* se asemejan al encontrado en sujetos sanos de regiones rurales africanas (De Filippo et al., 2010) y de Venezuela (Yatsunen et al., 2012). Lo curioso es que otros estudios (Lozupone et al., 2013) han mostrado que esta estructura microbiana, rica

en *Prevotella* y baja en *Bacteroides*, es característica de individuos en Estados Unidos infectados con VIH. Esta distribución al parecer es normal y característica de los amerindios y africanos sanos en zonas rurales, esto puede ser debido las dietas típicas de estas regiones, consideradas altas en carbohidratos complejos, bajas en proteínas, y con alto aporte de granos completos, en comparación con lo encontrado en EE. UU, cuya base nutricional esa basada en un alto aporte de grasas saturadas y proteína, con poco aporte de fibra (Lozupone et al., 2012). Erysipelotrichaceae ha sido asociada con la producción de FNT- α e inflamación crónica intestinal (Kaakoush, 2015), y aunque los estudios no son del todo consistentes (Labbé et al., 2014), sugiere una participación en eventos que pueden perturbar la salud del hospedero. Lachnospiraceae, por otro lado, ha sido asociada a individuos sanos no infectados con VIH (Jenq et al., 2015). Mientras que a *Blautia* y *Dorea* se les atribuyen propiedades antiinflamatorias en la mucosa intestinal, hay estudios que las muestran correlacionadas con el incremento de marcadores de permeabilidad intestinal en el plasma. (Lozupone et al., 2014).

No se evidenciaron incrementos en el género *Prevotella* o de las familias de las Enterobacteriaceae o Enterococcaceae. Sin embargo, se evidenció un cambio en el tipo de relación entre los géneros *Haemophilus* y *Veillonella*, en el grupo de controles, estas tenían una relación negativa y en los infectados presentaron una relación mutualista. Ambos tienen una alta actividad inmunomoduladora estimulando la producción de sustancias pro inflamatorias como, IL-8, IL-1 β y TNF- α (Khair et al., 1994; van den Bogert, Meijerink, Zoetendal, Wells, & Kleerebezem, 2014), sugiriendo el surgimiento de bacterias patógenas durante el curso de la infección.

Las diferencias halladas entre el presente análisis y estudios relacionados pueden ser debido a diferencias en el balance existente previo a la infección, así como factores externos tales como: estado de salud general, factores ambientales típicos de la región colombiana en el

departamento del Atlántico y otras características propias de una población mestiza como la nuestra.

El incremento presentado de las poblaciones de Firmicutes y Proteobacteria puede estar asociado a la pérdida de capacidad regulatoria en la producción de IgA en pacientes infectados con VIH. En este estudio se observó un incremento de los Firmicutes del 60% en los pacientes infectados, mientras que en los controles fue de un 30%, mostrando una tendencia relacionada con el aumento de los porcentajes de activación de células T CD4+. Por lo que sería importante estudiar los cambios en la producción de inmunoglobulinas y su relación en los cambios en la microbiota asociados a la infección con VIH.

La familia de las Lachnospiraceae se caracteriza por que muchos de sus integrantes tienen la habilidad de producir AGC. En personas sanas se han logrado medir altas concentraciones de AGC que van desde 70 mM, en el colon proximal, hasta 120 mM en el colon distal y aunque no se han adelantado estudios que muestren una disminución en la producción de AGC intestinal en pacientes infectados con VIH, si se han observado perturbaciones en aquellas que los producen.(Wong et al., 2006).

Teniendo en cuenta que se observó un aumento de la presencia de integrantes de la familia de las Lachnospiraceae formando nodos en el grupo de pacientes infectados se decidió realizar la cuantificación de dos genes asociados a la producción de butirato.

Se realizó la cuantificación del número de copias de los genes butiril-CoA acetato-transferasa (*but*) y gen butirato quinasa (*buk*) relacionados con la producción de butirato. Ésta se realizó por medio de PCR en tiempo real en utilizando SYBR Green para la detección y cuantificación, e iniciadores degenerados para cubrir un espectro más amplio de posibles variaciones de los genes estudiados(Brankatschk, Bodenhausen, Zeyer, & Burgmann, 2012). Se esperaba encontrar diferencias en el número de copias de los genes relacionados con la

producción de butirato entre pacientes infectados con VIH e individuos sanos no infectados (Cunningham-Rundles et al., 2011; Vázquez-Castellanos et al., 2015).

Luego de cuantificar el número de copias correspondientes los genes butirato kinasa (*buk*) y butiril-CoA: acetato CoA-transferasa (*but*) presente en las muestras fecales, no se pudo encontrar diferencia significativa entre los grupos estudiados, aunque sí se observó mayor recuento de copias del gen *but* al compararlos con el número de copias totales del gen *buk* ($p=0.0017$). Esto puede estar dado por el hecho de que la incorporación de butirato esta mediada principalmente por la transformación de acetato a butirato, en donde, la ruta de butirato kinasa (*buk*) produce solo un 28% del butirato intestinal, mientras que muchas más cepas alcanzan una producción del 85% usando la ruta de butiril-CoA acetato-transferasa (*but*)(Louis et al., 2010).

En el presente estudio no se puede asegurar que los géneros y familias encontrados son productores de AGC (Lachnospiraceae OTU 28, OTU 18), sin embargo, *Roseburia* es un fuerte productor de AGC cuyos sustratos fructosa, maltosa y almidón son característicos de nuestra dieta. *Dorea* no es productor de butirato, pero puede fermentar azúcares asociados a la degradación de carbohidratos complejos y además producir CO₂ e H⁺.

Al parecer, la resiliencia de la microbiota intestinal y su versatilidad metabólica le permite conservar la capacidad de producir AGC, *Prevotella* no se caracteriza por la producción de AGC, pero la promueve al tener la capacidad de degradar fibra, cuyos productos incluyen succinato y acetil-CoA (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014). Otros géneros como *Veillonella* pueden usar el succinato para producir propionato (Louis & Flint, 2017).

Algunos estudios muestran que un aumento de la producción de AGC disminuye la reacción inflamatoria contra el virus del VIH, ya que estimulan la diferenciación células T reguladoras, e incluso pueden actuar como facilitadores de la replicación viral debido a que inhiben la acción de la histona deacetilasa, fomentando la expresión del virus presente en

episomas y reactivando la expresión del provirus (Imai et al., 2012), es por esto que el aumento de las poblaciones productoras de AGC puede ser perjudicial desde el contexto de la infección por el VIH.

El presente trabajo tuvo las limitaciones típicas de un estudio observacional transversal. Bajo esta premisa solo es posible establecer asociaciones sin determinar factores causales, esto nos imposibilita afirmar si el cambio en las bacterias determinantes está dado por el incremento de la activación de las células T, o si los cambios en la microbiota son una consecuencia directa de la dinámica de la infección. También al estudiar la microbiota fecal como una representación de la mucosa intestinal, es imperativo desarrollar estudios que logren explorar directamente la comunidad microbiana adherida a la mucosa intestinal. Así como los AGC, hay otras sustancias que pueden tener un impacto inmunológico como los lipopolisacáridos o la proteína de unión a lipopolisacáridos que se asocia a la traslocación microbiana, o proteínas relacionadas con los procesos inflamatorios como la calprotectina y la lactoferrina fecal.

Los OTUs identificados como diferenciadores en el grupo de controles, tienen importancia debido a que esta caracterización de las bacterias en los individuos sanos nos da un indicio de cuál es el estado de equilibrio de la microbiota fecal en nuestra región, esto es relevante ya que muchos medicamentos propuestos para restaurar la microbiota intestinal son diseñados y recetados de acuerdo a perfiles desarrollados en países de otras latitudes (Green et al., 1999). Entre las bacterias seleccionadas a través de sPLS-DA, dentro del grupo de los controles, solo el género *Succinivibrio* (OTU 48) alcanzó una p_{adj} significativa. *Succinivibrio*, puede presentar asociaciones con integrantes del género *Prevotella*, que es fermentadora de polisacáridos como la inulina, la pectina y el almidón, esto puede ser aprovechado por el *Succinivibrio* que es un ávido fermentador de carbohidratos, como la maltosa que es el resultado

de la degradación del almidón o la fructosa, producto a su vez de la degradación de la inulina (Garrity et al., 2010).

Succinivibrio solo fermenta parcialmente el almidón, lo cual lo posiciona como iniciador en la cadena de degradación de polisacáridos complejos (Santos & Thompson, 2014), además, como resultado de la degradación de estos carbohidratos se produce lactato, el cual, es un metabolito característico de distintos microorganismos de uso probiótico (Ozyurt & Ötles, 2014). También produce acetato el cual es un ácido graso de cadena corta a partir del cual puede sintetizarse butirato por medio de la integración de acetil-CoA por integrantes del género *Coprococcus*. Todos ellos encontrados en nuestro grupo de controles sanos.

Por esto, es importante hacer nuevos estudios que permitan explorar nuestra identidad genética y microbiana, buscar nuevas aproximaciones como usar otras bacterias que ayuden a diferenciar células T reg y que no sean productoras de AGC, desarrollar terapias con antibióticos dirigidos, o el desarrollo de nuevos tipos de probióticos más acordes a la estructura de nuestra microbiota.

9. CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se muestra la riqueza y estructura de las comunidades de bacterias de personas sanas y pacientes infectados con el VIH, identificadas mediante secuenciación del gen 16S rARN a partir de ADN total extraído de muestras de heces.

El análisis de las comunidades microbianas mostró a nivel de filo, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria que estos presentaron una mayor abundancia, en una proporción distinta a lo reportado en estudios llevados a cabo en países occidentales desarrollados, mientras que, en el grupo de individuos infectados con VIH, Firmicutes fue el más abundante, seguido por Bacteroidetes y Proteobacteria

No se encontraron diferencias significativas en el número de copias de los genes *but* y *buk* entre el grupo de controles y pacientes infectados con VIH. Lo que nos indica que quizá no sea la aproximación adecuada para diferenciar las poblaciones para este estudio.

Se encontraron diferencias significativas en las abundancias entre los grupos taxonómicos entre el grupo control y los pacientes infectados; reportándose 263 familias, 122 órdenes, 69 clases y 531945 lecturas que correspondieron a 51 géneros bacterianos distintos.

Por medio del análisis por sPLS-DA y MetagenomeSeq se lograron identificar OTUs característicos dentro del grupo de infectados. También fue posible diferenciar los grupos al tener en cuenta el porcentaje de activación de células T CD4+. Las bacterias más representativas fueron Erysipelotrichaceae (OTU 43), Lachnospiraceae (OTU 28, OTU 18), *Catenibacterium*, *Streptococcus*, *Roseburia*, *Dorea*, *Alloprevotella* (OTU 7, OTU8) y *Bacteroidetes_unclassified*.

Dentro del escrutinio de las bacterias diferenciadoras dentro del grupo de los controles, y que sirvieran como posibles candidatas para su explotación y desarrollo de productos probióticos con fines terapéuticos, solo el OTU 48, correspondiente al género *Succinivibrio* tuvo

una significancia estadística relevante y, estudiando los criterios propuestos por la FAO y WHO, es un buen candidato para próximos estudios que permitan dilucidar si es apto para su confirmación e implementación como probiótico.

10. RECOMENDACIONES

Dadas las limitaciones intrínsecas de un estudio transversal observacional se recomienda estudios más profundos donde se logre hacer un seguimiento óptimo de la dinámica microbiana intestinal.

Aunque las bacterias encontradas concuerdan con observaciones que buscan establecer el núcleo o “core” microbiano humano, con el tamaño de muestra analizado es difícil establecer un “core” microbiano típico de nuestra región. Por lo que se recomienda desarrollar propuestas e investigaciones para la búsqueda de la creación de un microbioma Colombo-Latinoamericano.

Se recomienda un análisis profundo de las características *in vitro* del Succinivibrio OTU 48, para lograr aislar la especie observada, y evaluar si cumple con los demás requisitos que permitirían confirmar su potencial como organismo probiótico con el fin de desarrollar nuevos productos basados y orientados a nuestro propio microbioma.

REFERENCIAS

- Adair, K. L., & Douglas, A. E. (2017). Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition. *Current Opinion in Microbiology*, 35, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.002>
- Agudelo-Gonzalez, S., Murcia-Sanchez, F., Salinas, D., & Osorio, J. (2015). Infecciones oportunistas en pacientes con VIH en el hospital universitario de Neiva, Colombia. 2007-2012. *Infectio*, 19(2), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.11.008>
- Álvarez, V. R., Peña, Y. P., & Acosta, M. R. R. (2010). Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 29(3), 364–397.
- Anderson, M. J., Crist, T. O., Chase, J. M., Vellend, M., Inouye, B. D., Freestone, A. L., ... Swenson, N. G. (2011). Navigating the multiple meanings of β diversity: A roadmap for the practicing ecologist. *Ecology Letters*, 14(1), 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01552.x>
- Antonio, L., Rubio, S., Huertas, A. B., G, P. M., & Medina, C. (2014). Alimentos Funcionales con Probioticos, 113.
- Applied Biosystems. (2010). Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments (PN 4387779C). *Biosystems*.
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., & Ben Embarek, P. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03873>
- Arpaia, N. (2014). Keeping peace with the microbiome: acetate dampens inflammatory

- cytokine production in intestinal epithelial cells. *Immunology and Cell Biology*, 92(7), 561–562. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.40>
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., ... Honda, K. (2011). Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science*, 331(6015), 337–341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
- Bengmark, S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*, 42(1), 2–7. <https://doi.org/10.1136/gut.42.1.2>
- Berg, R. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, 4(11), 430–435. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10057-3](https://doi.org/10.1016/0966-842X(96)10057-3)
- Bergey, D. H. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes*. Springer-Verlag New York Inc. <https://doi.org/10.1007/b92997>
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Burgmann, H. (2012). Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4481–4489. <https://doi.org/10.1128/AEM.07878-11>
- Canard, B., & Sarfati, R. S. (1994). DNA polymerase fluorescent substrates with reversible 3'-tags. *Gene*, 148(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90226-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90226-7)
- Cao, L., Lê Cao, K.-A., Boitard, S., & Besse, P. (2011). Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-253>
- Castiblanco, C., & Ribón, W. (2006). Coinfección de tuberculosis en pacientes con VIH / SIDA : un análisis según las fuentes de información en Colombia. *Asociación Colombiana de Infectología*, 10(4), 232–242.
- Chen, W., Zhang, C. K., Cheng, Y., Zhang, S., & Zhao, H. (2013). A Comparison of Methods

- for Clustering 16S rRNA Sequences into OTUs. *PLoS ONE*, 8(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070837>
- Consolandi, C., Turrone, S., Emmi, G., Severgnini, M., Fiori, J., Peano, C., ... D'Elia, M. M. (2015). Behçet's syndrome patients exhibit specific microbiome signature. *Autoimmunity Reviews*, 14(4), 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.009>
- Cotta, M., & Forster, R. (2006). The family Lachnospiraceae, including the genera *Butyrivibrio*, *Lachnospira* and *Roseburia*. *The Prokaryotes*, 1002–1021.
https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_35
- Cunningham-Rundles, S., Ahrné, S., Johann-Liang, R., Abuav, R., Dunn-Navarra, A.-M., Grasse, C., ... Cervia, J. S. (2011). Effect of Probiotic Bacteria on Microbial Host Defense, Growth, and Immune Function in Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infection. *Nutrients*, 3(12), 1042–1070. <https://doi.org/10.3390/nu3121042>
- D'Argenio, V., & Salvatore, F. (2015). The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 451, 97–102.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>
- Deeks, S. G., Tracy, R., & Douek, D. C. (2013). Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity*, 39(4), 633–645.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.001>
- Delgado, R. (2011). Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.10.001>
- Deshpande, G. C., Rao, S. C., Keil, A. D., & Patole, S. K. (2011). Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Medicine*, 9(1), 92.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-92>
- Dietze, K. K., Zelinsky, G., Liu, J., Kretzmer, F., Schimmer, S., & Dittmer, U. (2013).

- Combining regulatory T cell depletion and inhibitory receptor blockade improves reactivation of exhausted virus-specific CD8⁺ T cells and efficiently reduces chronic retroviral loads. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003798.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003798>
- Dillon, S. M., Kibbie, J., Lee, E. J., Guo, K., Santiago, M. L., Austin, G. L., ... Wilson, C. C. (2017). Low abundance of colonic butyrate-producing bacteria in HIV infection is associated with microbial translocation and immune activation. *Aids*, 31(4), 511–521.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001366>
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism*, 13(5), 517–526.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Esparza, J. (2013). A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*, 31(35), 3502–3518. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.018>
- Esté, J. A., & Telenti, A. (2007). HIV entry inhibitors. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61052-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61052-6)
- Esteban, C. S. (2014). VIH: Infeccion aguda, pesquisa y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 419–424. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70058-6](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70058-6)
- Fallis, A. . (2013). Medicines from microbes. *Thesis*, 53(9), 1689–1699.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Frankel, W. L., Zhang, W., Singh, A., Klurfeld, D. M., Don, S., Sakata, T., ... Rombeau, J. L. (1994). Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology*, 106(2), 375–380.
<https://doi.org/10.5555/URI:PII:0016508594905959>

- Garber, K. (2015). Drugging the gut microbiome. *Nature Biotechnology*, 33(3), 228–231.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3161>
- Garrity, G., Bell, J., & Lilburn, T. (2010). Family I. Pseudomonadaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2B*, 323–379. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1229-3>
- Girard, M. P., Osmanov, S., Assossou, O. M., & Kieny, M.-P. (2011). Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine*, 29(37), 6191–6218. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.085>
- Gismondo, M. R., Drago, L., & Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 287–292. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00050-3)
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., ... Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789–799.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Gotelli, N. J., & Chao, A. (2013). *Measuring and Estimating Species Richness, Species Diversity, and Biotic Similarity from Sampling Data. Encyclopedia of Biodiversity* (Vol. 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00424-X>
- Gotelli, N. J., & Colwell, R. K. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4(4), 379–391.
<https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00230.x>
- Green, D. H., Wakeley, P. R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., & Cutting, S. M. (1999). Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4288–91. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473456>
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356),

512–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)

Hippe, B., Zwieler, J., Liszt, K., Lassl, C., Unger, F., & Haslberger, A. G. (2011).

Quantification of butyryl CoA:acetate CoA-transferase genes reveals different butyrate production capacity in individuals according to diet and age. *FEMS Microbiology Letters*, 316(2), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02197.x>

Imai, K., Yamada, K., Tamura, M., Ochiai, K., & Okamoto, T. (2012). Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(15), 2583–2592. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0936-2>

Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D. E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O., ... Rumbo, M. (2015). Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, 220(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.06.004>

Jennrich, R. I. (1970). An Asymptotic χ^2 Test for the Equality of Two Correlation Matrices. *Journal of the American Statistical Association*, 65(330), 904–912.

<https://doi.org/10.1080/01621459.1970.10481133>

Jenq, R. R., Taur, Y., Devlin, S. M., Ponce, D. M., Goldberg, J. D., Ahr, K. F., ... van den Brink, M. R. M. M. (2015). Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(8), 1373–1383. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.04.016>

Jiang, W., Lederman, M. M., Hunt, P., Sieg, S. F., Haley, K., Rodriguez, B., ... Brenchley, J. M. (2009). Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(8), 1177–1185. <https://doi.org/10.1086/597476>

Johnson, C. C., & Finegold, S. M. (1987). Uncommonly Encountered, Motile, Anaerobic

- Gram-Negative Bacilli Associated with Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 9(6), 1150–1162. <https://doi.org/10.1093/clinids/9.6.1150>
- Kabeerdoss, J., Shobana Devi, R., Regina Mary, R., & Ramakrishna, B. S. (2012). Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *British Journal of Nutrition*, 108(6), 953–957. <https://doi.org/10.1017/S0007114511006362>
- Kabouridis, P. S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S. H., Snippert, H. J., Clevers, H., ... Pachnis, V. (2015). Microbiota Controls the Homeostasis of Glial Cells in the Gut Lamina Propria. *Neuron*, 85(2), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.037>
- Khair, O. A., Devalia, J. L., Abdelaziz, M. M., Sapsford, R. J., Tarraf, H., & Davies, R. J. (1994). Effect of Haemophilus influenzae endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *The European Respiratory Journal : Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 7(12), 2109–16. <https://doi.org/10.1183/09031936.94.07122109>
- Khan, M. S., Khan, I. A., & Barh, D. (2016). *Applied Molecular Biotechnology: The Next Generation of Genetic Engineering*. Retrieved from <https://books.google.de/books?id=gQzYCwAAQBAJ>
- Klasse, P. J. (2012). Microreview The molecular basis of HIV entry. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01812.x>
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_1), 4578–4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R.

- (2011). Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. In *Current Protocols in Bioinformatics* (pp. 1–28). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
- Kumar, R., Eipers, P., Little, R. B., Crowley, M., Crossman, D. K., Lefkowitz, E. J., & Morrow, C. D. (2014). Getting started with microbiome analysis: Sample acquisition to bioinformatics. *Current Protocols in Human Genetics*, 2014(July), 18.8.1-18.8.29. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1808s82>
- Kurtz, Z. D. Z. D., Müller, C. L. C. L., Miraldi, E. R. E. R., Littman, D. R. D. R., Blaser, M. J. M. J., & Bonneau, R. A. R. A. (2015). Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLoS Computational Biology*, 11(5), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004226>
- Lederberg, B. J., & McCray, A. T. (2001). “Ome Sweet Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8. Retrieved from <https://lhncbc.nlm.nih.gov/files/archive/pub2001047.pdf>
- Lee, S. C., Tang, M. S., Lim, Y. A. L., Choy, S. H., Kurtz, Z. D., Cox, L. M., ... Loke, P. (2014). Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2880. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002880>
- Levine, U. Y., Looft, T., Allen, H. K., & Stanton, T. B. (2013). Butyrate-producing bacteria, including mucin degraders, from the swine intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3879–81. <https://doi.org/10.1128/AEM.00589-13>
- Lizarazo, J., Castro, F., de Arco, M., Chaves, Ó., & Peña, Y. (2006). Infecciones oportunistas del sistema nervioso central en pacientes con VIH atendidos en el Hospital Universitario Erasmo Meoz, Cúcuta, 1995-2005. *Infectio*, 10(4), 226–231.

- Louis, P., & Flint, H. J. (2007). Development of a semiquantitative degenerate real-time PCR-based assay for estimation of numbers of butyryl-coenzyme A (CoA) CoA transferase genes in complex bacterial samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 2009–2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.02561-06>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Louis, P., Young, P., Holtrop, G., & Flint, H. J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*, 12(2), 304–314. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x>
- Lozupone, C. A., Rhodes, M. E., Neff, C. P., Fontenot, A. P., Campbell, T. B., & Palmer, B. E. (2014a). HIV-induced alteration in gut microbiota. *Gut Microbes*, 5(4), 562–570. <https://doi.org/10.4161/gmic.32132>
- Lozupone, C. A., Rhodes, M. E., Neff, C. P., Fontenot, A. P., Campbell, T. B., & Palmer, B. E. (2014b). HIV-induced alteration in gut Microbiota: Driving factors, consequences, and effects of antiretroviral therapy. *Gut Microbes*, 5(4), 562–570. <https://doi.org/10.4161/gmic.32132>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lucas, S., & Nelson, A. M. (2015). HIV and the spectrum of human disease. *Journal of Pathology*, 235(2), 229–241. <https://doi.org/10.1002/path.4449>
- Maksoud, S. A., El Hadidi, M. N., & Amer, W. M. (1994). Beer from the early dynasties

- (3500–3400 cal B.C.) of Upper Egypt, detected by archaeochemical methods. *Vegetation History and Archaeobotany*, 3(4), 219–224. <https://doi.org/10.1007/BF00195198>
- Marchetti, G., Tincati, C., & Silvestri, G. (2013). Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 2–18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00050-12>
- Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F., & Grayson, M. L. (1995). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4), 475–479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03164.x>
- Montúfar Andrade, F., Quiroga, A., Builes, C., Saldarriaga, C., Aguilar, C., Mesa, M., & Zuleta Tobón, J. (2015). Epidemiología de la infección virus de inmunodeficiencia humana en pacientes hospitalizados en una institución de alta complejidad y enseñanza universitaria en Medellín, Colombia. *Infectio*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.05.004>
- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., ... Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, 4(18), 3514–3524. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>
- Nastasi, C., Candela, M., Bonefeld, C. M., Geisler, C., Hansen, M., Krejsgaard, T., ... Woetmann, A. (2015). The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Scientific Reports*, 5(1), 16148. <https://doi.org/10.1038/srep16148>
- Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O'Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F., ... Ferrenberg, S. (2013). Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 77(3), 342–56.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00051-12>

Notes, I. (2003). Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates

for Use in Quantitative PCR. *ReVision*, 1–8. Retrieved from

http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf

Nowak, P., Troseid, M., Avershina, E., Barqasho, B., Neogi, U., Holm, K., ... Sönnernborg, A.

(2015). Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection. *Aids*,

(SEPTEMBER), 1. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000869>

O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum

from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology*, 2(5), 17057.

<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>

Org, E., Parks, B. W., Joo, J. W. J., Emert, B., Schwartzman, W., Kang, E. Y., ... Lusi, A. J.

(2015). Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome*

Research, 25(10), 1558–1569. <https://doi.org/10.1101/gr.194118.115>

Ozyurt, V. H., & Ötles, S. (2014). Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food.

Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 13(4), 413–424.

<https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.4.8>

Paulson, J. N., Stine, O. C., Bravo, H. C., & Pop, M. (2013). Differential abundance analysis

for microbial marker-gene surveys. *Nature Methods*, 10(12), 1200–1202.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>

Petrić, I., Bru, D., Udiković-Kolić, N., Hršak, D., Philippot, L., & Martin-Laurent, F. (2011).

Evidence for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-

term PCB-contaminated soil under bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 195,

254–260. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.036>

Petrof, E. O., Gloor, G. B., Vanner, S. J., Weese, S. J., Carter, D., Daigneault, M. C., ... Allen-

- Vercoe, E. (2013). Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: “RePOOPulating” the gut. *Microbiome*, *1*(1), 3.
<https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-3>
- Pop, M. (2012). We are what we eat: how the diet of infants affects their gut microbiome. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-4-152>
- Porschen, R. K., & Chan, P. (1977). Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species. *Journal of Clinical Microbiology*, *5*(4), 444–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/858783>
- Preidis, G. A., & Versalovic, J. (2009). Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. *Gastroenterology*, *136*(6), 2015–2031. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.072>
- Prince, B. T., Mandel, M. J., Nadeau, K., & Singh, A. M. (2015). Gut Microbiome and the Development of Food Allergy and Allergic Disease. *Pediatric Clinics of North America*, *62*(6), 1479–1492. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.07.007>
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(5), 996–1047.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., & Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *The British Journal of Nutrition*, *101*(4), 541–550.
<https://doi.org/10.1017/S0007114508019880>
- Rozen. (2000). Primer3 Input (version 0.4.0). Retrieved October 20, 2017, from <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
- Salas, J. T., & Chang, T. L. (2014). Microbiome in Human Immunodeficiency Virus Infection.

- Clinics in Laboratory Medicine*, 34(4), 733–745.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.08.005>
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46(s2), S58–S61. <https://doi.org/10.1086/523341>
- Sankoh, O., Arthur, S., Nyide, B., & Weston, M. (2014). Prevention, treatment and future challenges of HIV/AIDS: A decade of INDEPTH research. *HIV {&} AIDS Review*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.hivar.2014.06.004>
- Santos, E. D. O., & Thompson, F. (2014). The family succinivibrionaceae. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*, 9783642389, 639–648. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_368
- Shankar, V., Gouda, M., Moncivaiz, J., Gordon, A., Reo, N. V, Hussein, L., & Paliy, O. (2017). Differences in Gut Metabolites and Microbial Composition and Functions between Egyptian and U.S. Children Are Consistent with Their Diets. *mSystems*, 2(1), e00169-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00169-16>
- Siberry, G. K., Abzug, M. J., Nachman, S., Brady, M. T., Dominguez, K. L., Handelsman, E., ... Nesheim, S. (2013). Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Exposed and HIV-Infected Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 32, i. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000437856.09540.11>
- Smith, P. F., Renner, R. M., & Haslett, S. J. (2016). Compositional data in neuroscience: If you've got it, log it! *Journal of Neuroscience Methods*, 271, 154–159.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.008>
- Southern, P. M. (1975). Bacteremia due to *Succinivibrio dextrinosolvens*. Report of a case. *American Journal of Clinical Pathology*, 64(4), 540–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1199976>

- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (2002). *Viruses and human disease*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-38965-8>
- Sugawara, E., & Nikaido, H. (2014). Properties of AdeABC and AdeIJK Efflux Systems of *Acinetobacter baumannii* Compared with Those of the AcrAB-TolC System of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7250–7257.
<https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>
- Surana, N. K., & Kasper, D. L. (2012). The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA. *Immunological Reviews*, 245(1), 13–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01075.x>
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., ... Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- van den Bogert, B., Meijerink, M., Zoetendal, E. G., Wells, J. M., & Kleerebezem, M. (2014). Immunomodulatory Properties of Streptococcus and Veillonella Isolates from the Human Small Intestine Microbiota. *PLoS ONE*, 9(12), e114277.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114277>
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., ... Keller, J. J. (2013). Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, 368(5), 407–415.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205037>
- Vázquez-Castellanos, J. F., Serrano-Villar, S., Latorre, A., Artacho, A., Ferrús, M. L., Madrid, N., ... Moya, A. (2015). Altered metabolism of gut microbiota contributes to chronic immune activation in HIV-infected individuals. *Mucosal Immunology*, 8(4), 760–772.
<https://doi.org/10.1038/mi.2014.107>

- Vital, M., Penton, C. R., Wang, Q., Young, V. B., Antonopoulos, D. a, Sogin, M. L., ... Tiedje, J. M. (2013). A gene-targeted approach to investigate the intestinal butyrate-producing bacterial community. *Microbiome*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-8>
- Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., ... Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- WHO. (2001). Probiotics in food. *Food and Nutrition Paper*, 85, 71. <https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>
- WHO. (2011). *Epidemic update and health sector progress towards Universal Access. Progress Report 2011.*
- Williams, W. B., Liao, H.-X., Moody, M. A., Kepler, T. B., Alam, S. M., Gao, F., ... Haynes, B. F. (2015). Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science*, 349(6249), aab1253--aab1253. <https://doi.org/10.1126/science.aab1253>
- Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., & Jenkins, D. J. A. (2006). Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235–243. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>
- Xiao, S., & Zhao, L. (2014). Gut microbiota-based translational biomarkers to prevent metabolic syndrome via nutritional modulation. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(2), 303–314. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12250>
- Yang, S.-T., Kiessling, V., Simmons, J. A., White, J. M., & Tamm, L. K. (2015). HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains. *Nature Chemical Biology*, 11(6), 424–431. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1800>

ANEXOS

A.1. Resultado de secuenciación profunda.

MUESTRAS	NÚMERO TOTAL DE LECTURAS(R1+R2)	Q30%
CSTOOL002	193.760	87,46
CSTOOL003	194.010	87,88
CSTOOL004	172.496	87,39
CSTOOL005	178.186	88,1
CSTOOL009	233.074	88,41
CSTOOL010	195.814	87,74
CSTOOL011	244.610	87,04
CSTOOL012	221.178	87,31
CSTOOL013	191.294	86,85
CSTOOL014	209.594	87,26
CSTOOL015	204.474	87,91
CSTOOL016	220.548	86,93
CSTOOL017	218.426	87,68
CSTOOL018	244.770	88
CSTOOL020	258.406	87,77
CSTOOL021	211.198	87,66
CSTOOL023	164.980	88,13
CSTOOL024	200.492	86,87
CSTOOL025	197.718	87,48
CSTOOL026	197.616	87,99
CSTOOL027	206.550	86,85
CSTOOL028	199.490	87,52
CSTOOL029	171.080	86,6
CSTOOL030	206.002	87,72
CSTOOL031	170.934	87,04
CSTOOL032	184.930	86,51
CSTOOL033	193.818	85,98
CSTOOL034	187.004	87,1
VSTOOL001	198.788	86,54
VSTOOL002	185.352	86,75
VSTOOL003	184.440	85,47
VSTOOL004	189.380	85,81
VSTOOL005	189.888	85,27
VSTOOL006	164.584	83,87
VSTOOL007	183.624	87,6
VSTOOL008	192.208	87,32
VSTOOL009	197.904	86,62
VSTOOL010	170.434	80,66
VSTOOL011	189.874	86,15

VSTOOL012	162.234	85,61
VSTOOL013	190.424	86,81
VSTOOL014	187.694	87
VSTOOL015	190.978	86,78
VSTOOL016	200.266	85,69
VSTOOL017	200.684	86,87
VSTOOL018	187.218	86,47
VSTOOL020	173.634	87,28
VSTOOL023	181.874	87,43
VSTOOL024	182.440	85,92
VSTOOL025	172.858	85,78
VSTOOL026	175.936	87,27
VSTOOL027	181.256	87,27
VSTOOL028	172.800	88,2
VSTOOL030	183.726	86,65
VSTOOL034	168.466	87,36
VSTOOL035	167.126	87,24
VSTOOL036	182.928	86,55
VSTOOL038	192.976	87,06

A.2 Valores MetagenomeSeq.

bacteria	1	2	scalingFactor	pvalues	adjPvalues	fname
OTU35	1,51485909	1,43267465	2,90267763	0,00042684	0,0141575	Control---VIH
OTU43	1,2068193	2,0788584	4,4634205	0,0005552	0,0141575	Control---VIH
OTU37	1,64289507	1,69571256	0,74930938	0,0014394	0,02363247	Control---VIH
OTU22	4,98097225	1,5781871	2,60508545	0,00185353	0,02363247	Control---VIH
OTU18	2,95836734	1,32049216	6,23683641	0,00389224	0,03970084	Control---VIH
OTU7	3,63767652	2,10487946	0,13326102	0,00532959	0,04530148	Control---VIH
OTU48	7,21995842	-2,71595834	-1,73419213	0,00634928	0,04625907	Control---VIH
OTU8	2,23385187	1,60207535	3,10555003	0,02130634	0,13582794	Control---VIH
OTU28	1,53568172	1,13197016	3,53391545	0,02547565	0,14436202	Control---VIH
OTU45	6,5253633	1,47714033	-1,24482561	0,03953056	0,18849318	Control---VIH
OTU44	0,79201273	0,95546222	5,05134918	0,04065539	0,18849318	Control---VIH
OTU21	1,26671558	0,78179103	9,95684073	0,08105943	0,34450258	Control---VIH
OTU1	2,55222099	-1,37787593	10,0830992	0,09349052	0,3667705	Control---VIH
OTU36	1,80788945	0,93031405	7,23739143	0,11448827	0,41706442	Control---VIH
OTU46	4,34090008	-1,1274004	1,77362812	0,12389986	0,42125954	Control---VIH
OTU42	1,10012211	0,82931605	5,54668002	0,15068386	0,48030482	Control---VIH
OTU26	1,97064662	0,71298724	8,35348939	0,19360042	0,58080127	Control---VIH
OTU33	1,51644075	0,43830639	4,88434048	0,24239971	0,68679919	Control---VIH
OTU5	1,44269133	0,63069156	3,31535043	0,28956143	0,73632167	Control---VIH
OTU31	2,09739195	0,61025938	10,8336474	0,31064292	0,73632167	Control---VIH
OTU17	1,24727436	-0,62682929	12,308963	0,31928965	0,73632167	Control---VIH
OTU6	1,42466332	0,59629551	12,14119	0,32200266	0,73632167	Control---VIH
OTU10	2,61588959	0,54441648	3,38367427	0,35775638	0,73632167	Control---VIH
OTU27	1,32889242	0,43970699	2,68357633	0,36610561	0,73632167	Control---VIH
OTU4	4,66113851	-0,73213838	12,1025662	0,36886293	0,73632167	Control---VIH

OTU12	3,09298222	-0,47673719	4,81174226	0,38627696	0,73632167	Control---VIH
OTU40	2,5272979	-0,39499394	6,34973068	0,38981736	0,73632167	Control---VIH
OTU38	1,32744413	0,34692903	5,83472896	0,41459286	0,75515127	Control---VIH
OTU24	2,57210121	0,42277144	4,95071643	0,46599254	0,81760019	Control---VIH
OTU25	2,33979041	0,51283708	10,5674114	0,48094129	0,81760019	Control---VIH
OTU51	1,83596508	-0,41873401	4,72613926	0,50495482	0,83073212	Control---VIH
OTU14	3,44992558	-0,42217154	4,69947496	0,56779849	0,85187153	Control---VIH
OTU49	2,09731022	0,3881164	1,03233281	0,56813406	0,85187153	Control---VIH
OTU29	6,13670628	0,34302874	5,90483552	0,58235299	0,85187153	Control---VIH
OTU41	3,35542146	0,29871985	7,58143357	0,58461772	0,85187153	Control---VIH
OTU2	1,71954155	-0,26536288	9,47681814	0,64634132	0,86961655	Control---VIH
OTU50	4,57438226	-0,39561177	7,42601108	0,65258696	0,86961655	Control---VIH
OTU34	0,78992101	0,18756238	4,40210258	0,6573648	0,86961655	Control---VIH
OTU30	7,84492602	0,18857001	6,32382159	0,66500089	0,86961655	Control---VIH
OTU23	2,30269096	0,32502436	6,18992066	0,68485097	0,87318499	Control---VIH
OTU3	1,57503679	-0,21357506	16,608733	0,71258779	0,8863897	Control---VIH
OTU15	1,11177338	0,20483894	9,20092887	0,75305395	0,90485198	Control---VIH
OTU20	3,21724778	-0,14805796	4,12571087	0,76291442	0,90485198	Control---VIH
OTU11	1,93159015	0,12792927	7,9350573	0,81188803	0,92244603	Control---VIH
OTU16	1,17719108	-0,14222	14,3631086	0,81392296	0,92244603	Control---VIH
OTU19	2,27918612	0,08747977	14,2963309	0,857294	0,95047813	Control---VIH
OTU32	1,64102855	-0,04236659	5,89932448	0,93186043	0,99091174	Control---VIH
OTU47	1,28721834	-0,05861561	7,389983	0,93262282	0,99091174	Control---VIH
OTU9	10,7453316	0,04512306	-6,04189191	0,95751525	0,99432615	Control---VIH
OTU13	5,61202009	-0,01744979	-1,34500729	0,97482956	0,99432615	Control---VIH
OTU39	2,01300276	-0,00088455	8,24610913	0,99847206	0,99847206	Control---VIH

A.3 Listado taxonómico correspondiente a los OTUs

Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia	Género
OTU1 "Bacteria(100)	Actinobacteria(100)	Actinobacteria(100)	Bifidobacteriales(100)	Bifidobacteriaceae(100)	Bifidobacterium(100)
OTU2 "Bacteria(100)	Bacteria_unclassified(100)	Bacteria_unclassified(100)	Bacteria_unclassified(100)	Bacteria_unclassified(100)	
OTU3 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidetes_unclassified(100)	Bacteroidetes_unclassified(100)	Bacteroidetes_unclassified(100)	
OTU4 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Bacteroidaceae(100)	Bacteroides(100)
OTU5 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Porphyromonadaceae(100)	Odoribacter(100)
OTU6 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Porphyromonadaceae	Parabacteroides

a(100)	0)			ae(100)	s(100)
OTU7 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Prevotellaceae(100)	Alloprevotella(100)
OTU8 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Prevotellaceae(100)	Alloprevotella(99)
OTU9 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Prevotellaceae(100)	Prevotella(100)
OTU10 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Prevotellaceae(100)	Prevotella(96)
OTU11 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Prevotellaceae(100)	Prevotella(97)
OTU12 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Prevotellaceae(100)	Prevotella(98)
OTU13 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Prevotellaceae(100)	Prevotella(99)
OTU14 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(100)	Bacteroidia(100)	Bacteroidales(100)	Rikenellaceae(100)	Alistipes(100)
OTU15 "Bacteria(100)	Bacteroidetes(99)	Bacteroidetes_unclassified(99)	Bacteroidetes_unclassified(99)	Bacteroidetes_unclassified(99)	
OTU16 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Bacilli(100)	Lactobacillales(100)	Streptococcaceae(100)	Streptococcus(100)
OTU17 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Clostridiales_unclassified(100)	
OTU18 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	
OTU19 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Blautia(100)
OTU20 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Coprococcus(100)
OTU21 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Dorea(100)
OTU22 "Bacteria	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Roseburia(100)

a(100)				00)	
OTU23 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Roseburia(97)
OTU24 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Roseburia(98)
OTU25 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Roseburia(99)
OTU26 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(100)	Ruminococcus2(100)
OTU27 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(98)	
OTU28 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Lachnospiraceae(99)	
OTU29 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	
OTU30 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	Faecalibacterium(100)
OTU31 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	Faecalibacterium(99)
OTU32 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	Gemmiger(91)
OTU33 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	Oscillibacter(100)
OTU34 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	Oscillibacter(98)
OTU35 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	Oscillibacter(99)
OTU36 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(100)	Ruminococcus(100)
OTU37 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(95)	
OTU38 "Bacteria	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(9	

a(100)				6)	
OTU39 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(97)	
OTU40 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(98)	
OTU41 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(100)	Clostridiales(100)	Ruminococcaceae(99)	
OTU42 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Clostridia(99)	Clostridiales(99)	Clostridiales_unclassified(99)	
OTU43 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Erysipelotrichia(100)	Erysipelotrichales(100)	Erysipelotrichaceae(100)	
OTU44 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Erysipelotrichia(100)	Erysipelotrichales(100)	Erysipelotrichaceae(100)	Catenibacterium(100)
OTU45 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Negativicutes(100)	Selenomonadales(100)	11	Dialister(100)
OTU46 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Negativicutes(100)	Selenomonadales(100)	Veillonellaceae(100)	Dialister(99)
OTU47 "Bacteria(100)	Firmicutes(100)	Negativicutes(100)	Selenomonadales(100)	Veillonellaceae(100)	Veillonella(100)
OTU48 "Bacteria(100)	Proteobacteria(100)	Gammaproteobacteria(100)	Aeromonadales(100)	Succinivibrionaceae(100)	Succinivibrio(100)
OTU49 "Bacteria(100)	Proteobacteria(100)	Gammaproteobacteria(100)	Enterobacteriales(100)	Enterobacteriaceae(100)	
OTU50 "Bacteria(100)	Proteobacteria(100)	Gammaproteobacteria(100)	Enterobacteriales(100)	Enterobacteriaceae(100)	Escherichia/Shigella(100)
OTU51 "Bacteria(100)	Proteobacteria(100)	Gammaproteobacteria(100)	Pasteurellales(100)	Pasteurellaceae(100)	Haemophilus(100)